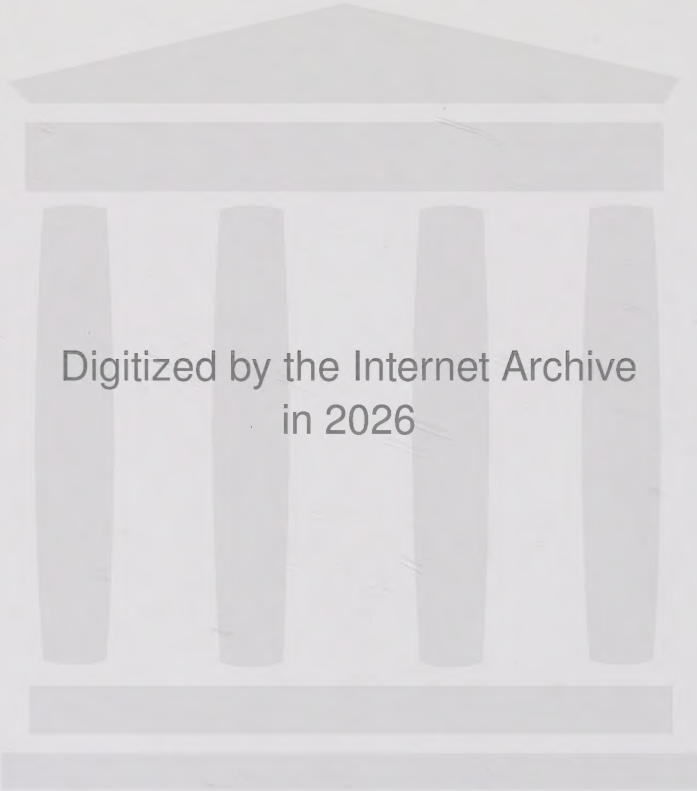


Analytik und Vorkommen des Mykotoxins Deoxynivalenol

Stephan Henkel

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c.mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedek

Analytik und Vorkommen
des
Mykotoxins Deoxynivalenol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Stephan Henkel
aus
Nürnberg
München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

1. Einleitung

2. Inhalt

2.1. Einleitung

2.2. Einleitung

2.3. Einleitung

2.4. Einleitung

2.5. Einleitung

2.6. Einleitung

2.7. Einleitung

2.8. Einleitung

2.9. Einleitung

2.10. Einleitung

2.11. Einleitung

2.12. Einleitung

2.13. Einleitung

2.14. Einleitung

2.15. Einleitung

2.16. Einleitung

2.17. Einleitung

2.18. Einleitung

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse

3.2. Ergebnisse

3.3. Ergebnisse

A) Einleitung	1
B) Schrifttum	2
1. Kurzfassung der Merkmale des Mykotoxins	2
2. Historischer Überblick	3
3. Physikalisch-chemische Eigenschaften	4
4. Deoxynivalenol-bildende Pilze	6
5. Natürliches Vorkommen	12
6. Deoxynivalenol-Toxikose	19
6.1. Toxizitätsdaten	19
6.2. Klinische Symptome	19
6.3. Pathophysiologische und pathohistologische Befunde	26
6.4. Metabolismus	27
7. Nachweisverfahren	29
7.1. Extraktions- und Reinigungsmethoden	30
7.2. Physikalisch-chemische Trenn- und Nachweisverfahren	36
7.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	36
7.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	40
7.2.3. Gaschromatographie (GC)	43
7.3. Weitere Nachweisverfahren	49
C) Eigene Untersuchungen	50
1. Material	50
1.1. Biologisches Material	50
1.2. Technisches Material	51

	Seite
1.2.1. Toxinstandard	51
1.2.2. Chemikalien	51
1.2.2.1. Extraktions- und Lösungsmittel	51
1.2.2.2. Derivatisationsmittel	51
1.2.3. Geräte zur Analytik	52
1.2.3.1. Säulenchromatographie	52
1.2.3.2. Dünnschichtchromatographie	52
1.2.3.3. Gaschromatograph mit Flammen- ionisation (GC-FID)	53
1.2.3.4. Gaschromatograph-Massenspektro- metrie (GC-MS)	53
2. Methoden	54
2.1. Vorversuche	54
2.1.1. Extraktionsmittel	54
2.1.2. Aufreinigung der Rohextrakte	54
2.1.3. Säulenchromatographische Aufreinigung	55
2.2. Nachweis von Deoxynivalenol in artifiziell kontaminierten Futtermitteln	58
2.2.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis	58
2.2.1.1. Fließmittel	58
2.2.1.2. Derivatisierungsverfahren	59
2.2.1.3. Bestimmung von Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate	60
2.2.2. Gaschromatographie-Flammenionisations- detektion (GC-FID)	62
2.2.2.1. Derivatisierungsmethoden	62

	Seite
2.2.2.2. GC-FID Bedingungen für den Nachweis von Deoxynivalenol	62
2.2.2.3. Überprüfung der Linearität des Detektors	63
2.2.2.4. Bestimmung von Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate	63
2.3. Analytik und Nachweis von Deoxynivalenol in Feldproben	64
2.3.1. Extraktion und Aufreinigung	64
2.3.2. Analytische Dünnschichtchromatographie	66
2.3.3. Präparative Dünnschichtchromatographie	66
2.3.4. GC-FID und GC-MS	67
3. Ergebnisse und deren Besprechung	69
3.1. Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung des artifizieell kontaminierten Probenmaterials	69
3.2. Ergebnisse zum Nachweis von Deoxynivalenol in artifizieell kontaminierten Probenmaterial	73
3.3. Ergebnisse zur Analytik von Deoxynivalenol in Feldproben	80
3.3.1. Resultate der DC-Untersuchungen	80
3.3.2. Resultate der GC-FID und GC-MS Untersuchungen	82
3.3.3. Zusammenfassende Gegenüberstellung der Ergebnisse	88
D) Diskussion	90
E) Zusammenfassung	96
Summary	99
F) Literaturverzeichnis	101
Lebenslauf	

A) Einleitung

Das Mykotoxin Deoxynivalenol (Vomitoxin) ist eines von vielen toxischen Stoffwechselprodukten der Feldpilze der Gattung *Fusarium* und deren perfekten Formen (UENO, 1980).

Charakterisiert ist dieses Mykotoxin durch seine allgemeine Zytotoxizität. Nach oraler Aufnahme kann Deoxynivalenol bei Mensch und Tier Erbrechen und andere gastroenteritische Symptome auslösen. In der Bundesrepublik Deutschland wurde Deoxynivalenol in Futtermitteln (GEDEK und BAUER, 1983; THALMANN et al., 1985) und Lebensmitteln (BLAAS et al., 1984) nachgewiesen. Da die Nachweismöglichkeiten für Deoxynivalenol nicht immer, wegen der geringen Hauttoxizität, zufriedenstellend waren - im Gegensatz zu anderen strukturverwandten Mykotoxinen (T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol) - werden an die Analytik von Deoxynivalenol besondere Anforderungen gestellt (GAREIS et al., 1985).

Es wurde mir die Aufgabe zuteil, die bereits bekannten physikalisch-chemischen Verfahren zur Analytik von Deoxynivalenol auf ihre Leistungsfähigkeit zu überprüfen und eines davon für die routinemäßige Diagnostik weiterzuentwickeln, wobei die Eignung der Methode durch die Untersuchung einer repräsentativen Probenzahl unter Beweis zu stellen war. Zugleich sollte mit Letzterem ein Beitrag zum derzeitigen Vorkommen des Mykotoxins Deoxynivalenol hierzulande in Cerealien und anderen Nahrungsmitteln geleistet werden.



B) Schrifttum

1. Kurzfassung der Merkmale des Mykotoxins

Name:	Deoxynivalenol (DON)
Chemische Bezeichnung:	3 α ,7 β ,15-trihydroxy-12,13-epoxy- trichothec-9-en-8-on
Synonyme:	Vomitoxin, Rd-Toxin
Einordnung:	Mykotoxine, Trichothecene, Ketotrichothecene, Sesquiterpenoide
Strukturformel:	

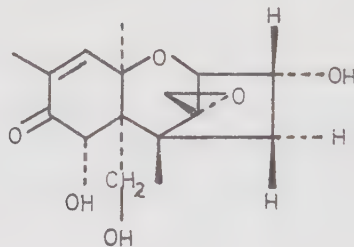


Abbildung 1

Summenformel:	$C_{15}H_{20}O_6$
Natürliche Produzenten:	Fusarien spezie (u.a. <i>F. graminearum</i>)
Vorkommen:	Weltweit in Futter- und Nahrungsmitteln, insbesondere Getreide (Mais)
Nachweis:	Physikalisch-chemische Methoden
Empfängliche Tierarten:	Alle Haustiere
Symptomatik:	Unspezifische Symptomatik; im Vordergrund stehen Erbrechen und gestörtes Allgemein- befinden

2. Historischer Überblick

Deoxynivalenol (DON) wurde erstmals 1972 von den Japanern MOROOKA et al. beschrieben. Sie charakterisierten das Toxin als Metabolit eines *Fusarium roseum*-Stammes, der aus verschimmelter Gerste isoliert wurde.

Die entdeckte Substanz erwies sich als identisch mit dem sogenannten "emetic factor" (Vomitoxin), den 1973 VESONDER und Mitarbeiter in den USA aus Mais isolierten. Dieser Mais war mit *Fusarium graminearum* infiziert.

Groß angelegte Serienuntersuchungen von Cerealien fanden ab Ende der siebziger Jahre statt (VESONDER et al., 1978; YOSHIKAWA, 1983). Erst in jüngerer Zeit werden auch andere Nahrungsmittel in größerem Umfang auf Deoxynivalenol untersucht (BLAAS et al., 1984; SWANSON et al., 1986).

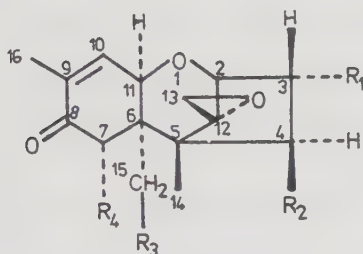
3. Physikalisch-chemische Eigenschaften

Deoxynivalenol ist eines von bislang an die 100 bekannten Trichothecen, deren Grundstruktur durch ein trizyklisches Trichothecangerüst und eine Epoxydgruppe an C-12/C-13 gekennzeichnet ist. Nach UENO (1980) und COLE und COX (1981) werden die Trichothecene aufgrund struktureller Unterschiede in vier Gruppen eingeteilt, wobei sich die Gruppen A und B nur durch das Vorhandensein oder Fehlen der Ketogruppen bei C-8 unterscheiden. Mit zwei Epoxydgruppen im Molekül werden Crotocol und Crotocin zur Gruppe C, den Diepoxyden, gezählt. Bei den makrozyklischen Trichothecen der Gruppe D wird das trizyklische Trichothecangerüst durch eine weitere Ringverbindung in Form einer Diesterverbindung ergänzt.

Deoxynivalenol ist ein Vertreter der Ketotrichothecene (Gruppe B), die sich durch die Ketogruppe an C-8 von den übrigen Trichothecen unterscheiden. DON ist charakterisiert durch drei Hydroxygruppen an den C-Atomen 3, 7, 15 und dem Wasserstoffrest in C-4 Stellung. In Tabelle 1 sind die bislang bekannten Toxine der Gruppe B aufgeführt.

Deoxynivalenol ist eine farblose, kristalline, optisch aktive Substanz mit hoher Stabilität im festen Zustand. Bei Raumtemperatur gelagert, erfährt DON im festen Zustand über Jahre hinweg keinen Aktivitätsverlust. Die Alkohole werden durch geeignete Oxidationsmittel ($\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$) zu Ketonen und Aldehyden oxidiert. Der Epoxydring wird bei höheren Temperaturen (siedendes Wasser) durch Säure-

Tabelle 1 : Nomenklatur und Struktur der Ketotrichothecene



Toxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Summenformel
Trichothecolon	H	H	O	H	C ₁₅ H ₂₀ O ₄
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	C ₁₅ H ₂₀ O ₆
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	C ₁₅ H ₂₀ O ₇
3-Acetyldeoxynivalenol	OAc	H	OH	OH	C ₁₇ H ₂₂ O ₇
7-Acetyldeoxynivalenol	OH	H	OH	OAc	C ₁₇ H ₂₂ O ₇
Fusarenon-X	OH	OAc	OH	OH	C ₁₇ H ₂₂ O ₈
Trichothecin	H	OCOCH=CHCH ₃	H	H	C ₁₉ H ₂₄ O ₅
3,15-Diacetyldeoxynivalenol	OAc	H	OAc	OH	C ₁₉ H ₂₄ O ₈
Diacetylnivalenol	OH	OAc	OAc	OH	C ₁₉ H ₂₄ O ₉

hydrolyse (pH 3) geöffnet. Die Epoxydringöffnung ist ebenfalls durch Reduktion mit LiAlH_4 möglich. In organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Aceton, Ethylacetat, Alkohol und Acetonitril zeigt DON ein gutes Lösungsverhalten, in Wasser hingegen ist Deoxynivalenol weniger gut löslich (TAMM, 1977; MIROCHA, 1979; UENO, 1980).

4. Deoxynivalenol-bildende Pilze

Deoxynivalenol wird von Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Fusarien gehören der Familie der Tuberculariaceae an. Hier sind sie in die Unterabteilung der Deuteromycotica einzuordnen (GEDEK, 1980). Die ubiquitär verbreiteten Fusarien kommen sowohl als Dauerformen im Boden, wie auch als saprophytisch oder parasitär lebende Pilze auf einer Vielzahl von Pflanzen vor (DOMSCH et al., 1980). Nach NEERGARD (1977) werden Gramineen bevorzugt befallen. Durch den Pilzbefall wird bei der Pflanze eine als Fusariose bezeichnete Krankheit hervorgerufen (MALALASKERA et al., 1973; KOMMEDAHL und WINDELS, 1977). Fusarien treten im Gegensatz zu Penicillien auch an unverletzten Stellen der Pflanzen auf. Selbst die den Maiskolben einhüllenden Lieschblätter bilden keinen Schutz vor dem Fusarienbefall (GRUBER und THALMANN, 1981).

In der Kultur erscheint das Luftmycel der Fusarien flockig oder filzig. Abhängig von Umwelteinflüssen (Substrat, Temperatur, Feuchte) und Alter der Kultur werden verschiedenfarbige Pigmente gebildet.

Diese variieren zwischen weiß, gelb, orange, purpur, violett, braun und schwarz (WOLLENWEBER, 1932).

Mikroskopisch sind die Fusarien an deutlich sichelförmigen bis spindelförmigen (=fusiform) Makrokonidien zu erkennen. Während die Makrokonidien durch Septen gekammert sind, weisen die Mikrokonidien keine Querwände auf und sind demzufolge einkammerig (Abb. 2). Morphologische Variationen führten zu unterschiedlichen Bezeichnungen und der Aufstellung einer großen Zahl von Spezies (WOLLENWEBER und REINKING, 1935; SNYDER und HANSEN, 1945). Die hieraus resultierenden taxonomischen Schwierigkeiten dauern noch heute an. Sehr häufig wird noch bei der Zuordnung der Fusarien der Einteilung von SNYDER und HANSEN (1945) gefolgt und die Nomenklatur von BOOTH (1971) der Artenbestimmung zugrunde gelegt. Von NELSON und Mitarbeitern wurde 1983 eine weitere taxonomische Einteilung zur Identifizierung der Fusarien publiziert.

Deoxynivalenol wird als sekundärer Stoffwechselmetabolit hauptsächlich von *Fusarium roseum* und *Fusarium graminearum* gebildet. Auch *Gibberella zeae*, die fruchtkörperbildende Form von *Fusarium graminearum*, ist in der Lage DON zu produzieren. GREENHALGH et al. (1983) untersuchten drei Stämme von *Fusarium graminearum* in Abhängigkeit von Substrat, Temperatur und Luftfeuchte auf deren Toxinbildungsvermögen (Tab. 2). Die Pilze wurden auf Mais und Reis angezüchtet. Reis erwies sich als geeigneteres Nährmedium, wobei der höchste Gehalt an DON (515 mg/kg) bei einer Luftfeuchte von 40% und einer Inkubationsdauer von 24 Tagen (bei 28° C) analysiert wurde. Von VESONDER et al. (1982) wurden *Fusarium graminearum* (NRRL 5883) und *Fusarium roseum* (NRRL 6101)



Abbildung 2 : *Fusarium graminearum*: Ascus und Ascosporen aus der Kultur (A,B); Konidien und Konidiophoren (C) (nach BOOTH, 1971)

auf Mais verimpft. Während mit *Fusarium graminearum* bei 30°C und 40 Tagen Inkubation die höchste Konzentration an Toxin erreicht wurde, war mit *Fusarium roseum* bei 26°C und 41 Tagen Inkubation das Maximum der Toxinbildung messbar. Hinsichtlich des Ausmaßes der Bildung an Toxin erwies sich *Fusarium graminearum* als potenter als *Fusarium roseum*. Die Tabelle 3 enthält eine Gegenüberstellung der wichtigsten Ergebnisse der Deoxynivalenol-Produktion unter Laborbedingungen.

Neben Deoxynivalenol bilden Fusarien noch andere Mykotoxine. *Fusarium graminearum* produziert z.B. Zearalenon und dessen Derivate. Das Bildungsvermögen für DON ist bei *Fusarium graminearum* jedoch mehr als doppelt so hoch zuveranschlagen wie für Zearalenon (GREENHALGH et al. 1983). ICHNIOE et al. (1983) züchteten aus Reis, Hafer und Weizenproben 113 Isolate von *Gibberella zeae* an und untersuchten diese Isolate auf ihre Befähigung zur Mykotoxinbildung. 93% der Stämme bildeten Trichothecene. Entweder wurden Nivalenol und Fusarenon-X, oder Deoxynivalenol und Acetyl-Deoxynivalenol nachgewiesen. Eine gleichzeitige Produktion von Nivalenol und Deoxynivalenol bzw. von Fusarenon-X und Deoxynivalenol fand nie statt. Bei 68% der Trichothecene-produzierenden Isolate war ein gleichzeitiger Nachweis von Zearalenon möglich. Mit ¹³C markierten Molekülen im Nährsubstrat war es BLACKWELL et al. (1985) möglich aufzuzeigen, daß *Fusarium graminearum* (Stamm M 69) nebeneinander Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol, Butenolid und Zearalenon bildet. Aus *Fusarium culmorum*-Kulturen (Stamm HLX 1503) konnte außer Deoxynivalenol auch noch 3-Acetyl-Deoxynivalenol isoliert werden.

Tabelle 2 : Deoxynivalenol-Produktion durch *Fusarium graminearum*
auf Reis in Abhängigkeit von Luftfeuchte und Zeit
(GREENHALGH et al., 1983)

Luftfeuchte (%)	Inkubationszeit (d)	Deoxynivalenol (mg/kg)
30	15	53,5
	21	66,3
	24	107,0
35	15	332,0
	21	367,0
	24	394
40	15	309
	21	411
	24	515
48	15	43
	21	171
	24	253

pH-Wert : 5,5
Temperatur : 28°C
Standkultur : dunkel
CO₂-Gehalt : 22%

Tabelle 3 : Deoxynivalenol-Bildung durch verschiedene Fusarien-
arten in Standkultur bei 28°C

Stamm (Typen- bezeichnung)	Substrat	mg/kg DON	Inkubations- zeit (Tage)	Literatur
Fus. graminearum	Reis	1,2	(28)	GREENHALGH et al.
DAOM 180 377		1,2	(28)	(1983)
DAOM 180 378		225	(21)	
DAOM 180 379		317	(21)	
	Mais			
DAOM 180 377		127	(21)	
DAOM 180 378		182	(28)	
DAOM 180379		214	(21)	
Fus. graminearum	Mais	396	(21)	VESONDER et al.
NRRL 5889		396	(21)	(1982)
		625	(60)	
Fus. roseum				
NRRL 6101		150	(21)	
		170	(60)	
Fus. graminearum	GYEP-Nähr- medium*			MILLER et al.
DAOM 177 406		1430	(10)	(1983)
DAOM 180 376		1490	(10)	
M 69		2470	(10)	
M 74		299	(10)	
Fus. roseum				
ATCC 28 114		432	(10)	
Fus. graminearum				ENGELHARDT et al.
Stamm 183	Reis	740	(30)	(1986)
	Hafer	50	(15)	
	Mais	50	(25)	
Fus. tricinctum				
Stamm 434	Reis	824	(30)	
	Mais	111	(24)	

* GYEP-Nährmedium = 10 g Glucose und 1 g Pepton auf 1 l Wasser

5. Natürliches Vorkommen

Die auf Fusarien zurückzuführende Kontaminationen von Lebens- und Futtermitteln mit Deoxynivalenol kommen nahezu weltweit vor; primär stellen sie jedoch ein Problem der gemäßigten und kalten Klimazonen dar. Nach BLAAS et al. (1984) wird in der Bundesrepublik Deutschland das Expositionsrisiko des Menschen für DON als gering eingestuft. Dagegen scheint in Japan und der UdSSR die Gesundheitsgefährdung durch Trichothecene größer zu sein. Dafür nehmen in Europa die Fusariosen bei Pflanzen ständig zu. Dieser steigende Befall ist nach WIMMER (1978) auf die Monokulturen und die geänderten Düngemethoden zurückzuführen. Tabelle 4 zeigt einen höheren Anteil an positiven Proben (558) in Nordamerika. Während in Kanada vor allem der Weizen mit DON kontaminiert war (=88% der kontaminierten Futtermittel), befanden sich unter den 437 positiven Proben aus den USA nur 106 Weizenproben (=24,3%) mit Deoxynivalenol. In den USA erwies sich stattdessen der Mais (mit 178 DON-haltigen Proben = 40,7%) als hauptsächlich mit diesem Trichothecen kontaminiert. Die höchste Deoxynivalenol-Konzentration von 50,0 mg/kg wiesen MIROCHA et al. (1976) in einem Mischfutter nach. Die Werte der in Kanada untersuchten Proben schwankten zwischen 0,05 mg/kg und 8,53 mg/kg (NEISH et al., 1983; TRENHOLM et al., 1983). In Japan wurden von YOSHIZAWA (1983) und TANAKA et al. (1985) häufig DON und Nivalenol gleichzeitig in Weizen in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,005 - 0,74 mg/kg nachgewiesen. In der Milch von mit fusarienhaltigem Futter ernährten Kühen detektierten SWANSON et al. (1986) 0,3 mg/l Deoxynivalenol. 1982 untersuchte das Centralia Diagnostic

Tabelle 4 : Natürliches Vorkommen von Deoxynivalenol in Futter- und Nahrungsmitteln

Herkunft	Material	Anzahl pos. Proben/ untersuchte Proben	Konzentration mg/kg	Nachweis- methoden	Literatur
Bundesre- publik Deutschland	Hafer	4 / n.a.	1,00 - 20,00	DC	GEDEK und BAUER (1983)
	Hafer	1 / 1	20,00	DC	BAUER und GEDEK (1980)
	Lebensmittel	30 / 42	0,04 - 2,00	GC-MS	BLAAS et al. (1984)
	Weizen (43)				GRUBER und THALMANN (1981)
	Mais (7)				
	Gerste (37)	4 / 101			
	Hafer (6)				
	Roggen (1)				
	Mischfutter (8)				
	Weizen	5 / 123	0,01 - 1,30	GC-ECD	THALMANN et al. (1985)
	Mais	10 / 35	0,03 - 2,00		
	Gerste	6 / 123	0,01 - 0,10		
	Hafer	11 / 72	0,02 - 0,50		
	Roggen	1 / 23	0,10		
	Mischfutter	2 / 17	0,02 - 0,13		
Dänemark	Gerste	1 / 36	1,00	GC-FID	HALD und KROGH (1983)
Frankreich	Mais	2 / n.a.	0,14 - 0,60	GC-FID	JEMMALI et al. (1978)
Japan	Weizen	28 / 38	0,10 - 12,40	GC-MS	YOSHIZAWA (1983)
	Gerste	72 / 90	0,05 - 49,60		
	Weizen	3 / 4	0,005 - 0,74	GC-ECD	TANAKA et al. (1985)
	Gerste	13 / 14	0,003 - 0,35		
Kanada	Weizen	4 / n.a.	1,49 - 1,55	GC-ECD	BENNETT et al. (1983)
	Weizen	71 / 72	0,01 - 7,00	GC; GC-MS	SCOTT et al. (1983)
	Weizen	16 / 41	0,50 - 8,53	GC-MS	TRENHOLM et al. (1984)
	Weizen	1 / n.a.	0,45	GC-ECD; GC-MS	YOUNG et al., (1984)
	Weizen	1 / n.a.	7,60	GC-MS	FRIEND et al. (1983)
	Weizen	1 / n.a.	3,30	GC-ECD; GC-MS	EL-BANNA (1983)
	Weizen	1 / 2	2,00	DC; GC-MS	HART und BRASELTON (1983)
	Weizen	12 / über 300	0,10 - 0,60	GC-ECD	COHEN und LAPOINTE (1982)
	Gerste		0,24 - 0,43		
	Hafer		0,08 - 0,11		
	Mais		0,47 - 0,89		
	Mais	7 / 124	0,05 - 6,30	GC-ECD	NEISH et al. (1983)
	Mais	4 / n.a.	0,60 - 2,20	GC-ECD	SCOTT (1983)
	Weißbrot	3 / n.a.	0,35 - 0,75	GC-MS	GREENHALGH et al. (1984)
	Schwarzbrot				
Österreich	Mais	56 / 60	1,00 - 20,00	GC-FID	LEW et al., (1979)
	Mais	116 / n.a.	0,50 - 9,20	HPLC	LEIBETSEDER (1982)
	Maissilage	n.a. / n.a.	0,15 - 0,60	n.a.	HALAMA (1982)
Südafrika	Mais	9 / n.a.	0,07 - 7,40	DC; GC-MS	MARASAS et al. (1977)
Taiwan	Mais	8 / 105	0,10 - 0,31	DC; GC-n.a.	TSENG (1983)
Ungarn	Mais	2 /	0,20 - 1,30	GC-FID	BATA et al. (1983)
	Weizen	1 / 23	0,50		

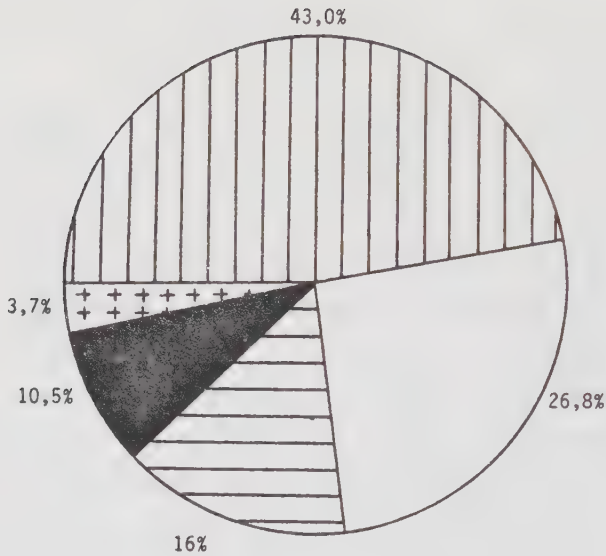
Fortsetzung Tab. 4:

Herkunft	Material	Anzahl pos. Proben/ untersuchte Proben	Konzentration mg/kg	Nachweis- methoden	Literatur
USA	Mais	24 / 52	0,50 - 10,70	GC-FID	VESONDER et al. (1978)
	Mais	23 /	0,01 - 40,00	GC-MS	VESONDER (1983)
	Mischfutter	11 /	0,04 - 50,00		MIROCHA (1979)
					MIROCHA et al. (1976)
					FORSYTH et al. (1976)
					STAHR et al. (1979)
	Mais	129 /	0,10 - 41,60	DC; GC-n.a.	COTE et al. (1984)
	Mischfutter	134 /			
	Weizen	4 / 342			
	Hafer	7 /			
	Weizen	33 / 35	1,78 - 0,26	GC-MS	HAGLER et al. (1984)
	Weizen	54 / 57	0,20 - 9,00	DC; GC-MS	EPPLEY et al. (1984)
	Weizen	15 / n.a.	0,12 - 3,43	GC-MS	CHANG et al. (1984)
	Mais	2 / 2	20,00	HPLC	ABBAS et al. (1986)
	Milch	1 / n.a.	0,30	GC-FID	SWANSON et al. (1986)
	Weizen	1 / 4	0,09	GC-ECD	TANAKA et al. (1985)
	Popcorn	6 / 6	0,01 - 0,25		

Laboratory/Illinois 342 Futtermittel auf Deoxynivalenol. Bei 274 Proben (= 80%) betrug die Deoxynivalenol-Konzentration zwischen 0,1 mg/kg und 41,6 mg/kg. In der Hauptsache handelte es sich bei den positiven Proben um Mischfuttermittel (39%) oder Gerste (38%). Der durchschnittliche Toxingehalt betrug 4,0 mg/kg bei Mischfuttermittel und 2,5 mg/kg bei Gerste (COTE et al., 1984).

In der Bundesrepublik Deutschland führten GEDEK und BAUER (1983) in den Jahren 1974 - 1980 mikrobiologische Untersuchungen an 789 Futterproben des heimischen Marktes durch. Bei 32% der Proben konnte ein Fusarienbefall diagnostiziert werden. In einigen Fällen wurde eine Korrelation zwischen infiziertem Futtermittel und Schäden beim Nutztier hergestellt.

Die höchsten Deoxynivalenol-Konzentrationen innerhalb Europas wurden bislang bei Untersuchungen in Deutschland und Österreich festgestellt. GEDEK und BAUER (1983) wiesen in einer Haferprobe 20 mg/kg DON nach. LEW et al. (1979) analysierten in einer Maisprobe 20,0 mg/kg. Die Durchschnittswerte für Deoxynivalenol liegen in Europa mit 0,5 mg/kg bis 1,2 mg/kg deutlich unter den Werten Amerikas. Abbildung 3 zeigt den prozentualen Anteil der positiven Deoxynivalenol-Proben bei den einzelnen Nahrungsmitteln auf. Abbildung 4 gibt den Anteil der positiven DON-Proben an der Gesamtzahl der untersuchten Proben wieder. Neben Deoxynivalenol werden aus den Futtermitteln oft weitere Mykotoxine extrahiert. So beschreiben HAGLER et al. (1984) ein paralleles Vorkommen von Deoxynivalenol, Zearalenon und Aflatoxin B₁ in Weizenproben aus den USA. Hier konnten bei 35 mit *Fusarium roseum* infizierten Futtermitteln in 33 Proben Deoxynivalenol und in drei dieser



-  Mais (n = 396)
-  Weizen (n = 247)
-  Mischfutter (n = 147)
-  Hafer, Gerste (n = 96)
-  Lebensmittel (n = 34)

Abbildung 3 : Prozentuale Verteilung positiver Deoxynivalenol-Proben aufgeschlüsselt nach Art des Probenmaterials

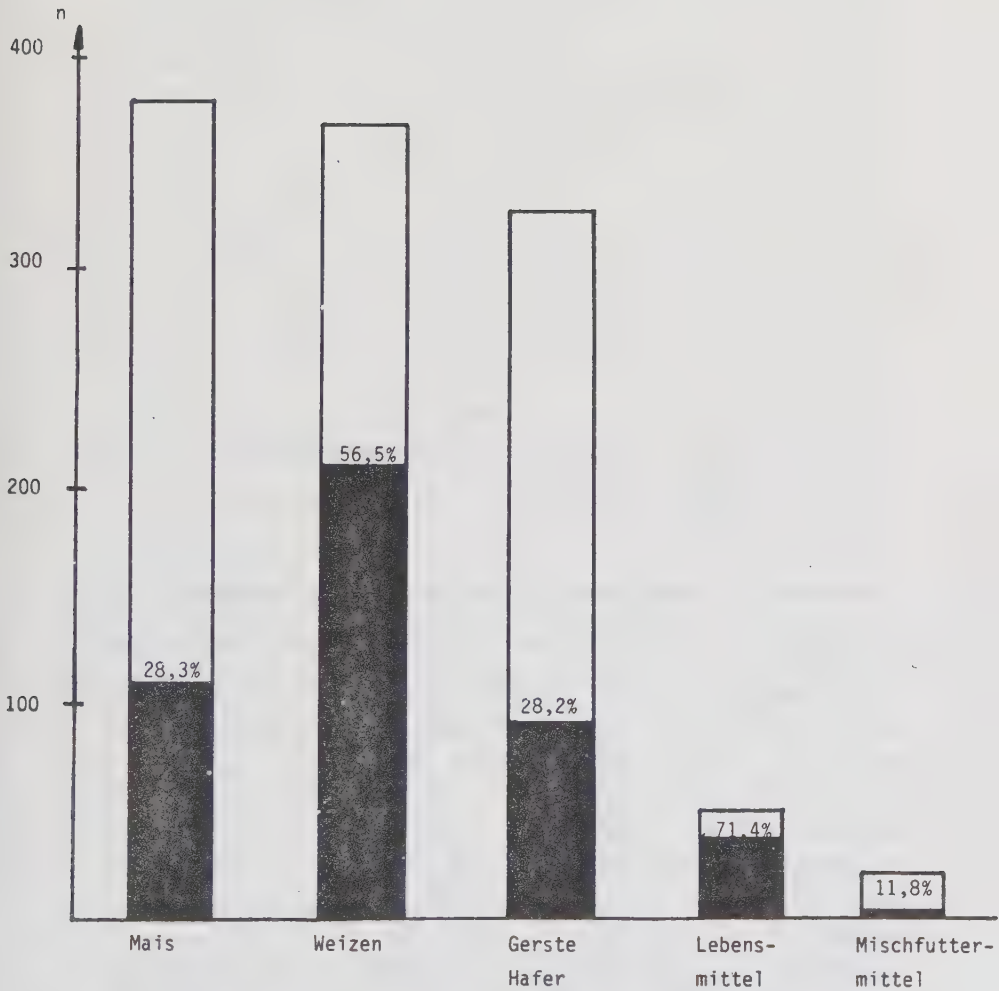


Abbildung 4 : Anteil der positiven Proben im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Proben

Proben gleichzeitig Zearalenon nachgewiesen werden. BLAAS et al.

(1984) untersuchten Lebensmittel auf Deoxynivalenol (Tab. 5).

71% der Proben enthielten DON, in 38% dieser positiven Proben konnte auch Nivalenol detektiert werden.

Tabelle 5: Vorkommen von Deoxynivalenol in Lebensmitteln nach
BLAAS et al., 1984

Lebensmittel	pos. Proben (untersuchte)	Deoxynivalenol µg/kg	Durchschnittswert Deoxynivalenol µg/kg
Corn Flake	1 (3)	15	-
Haferflocken	1 (1)	15	-
Maisgrieß	1 (1)	40	-
Müsli	2 (2)	10 - 30	15
Nudeln	1 (2)	60	-
Weizen-Vollkorn	1 (4)	15	-
Weizengrieß	3 (3)	15 - 60	30
Weizenknäckebröt	1 (1)	15	-
Weizenmehl	2 (2)	15 - 40	27
Weizenkleie	16 (16)	15 - 2000	180,4
Weizenschrot	1 (3)	30	-

6. Deoxynivalenol-Toxikose

6.1. Toxizitätsdaten

Bei Verabreichung von Standardtoxin an Säugetiere erwies sich die Maus ($LD_{50} = 46 \text{ mg/kg/KGW}$) weitaus empfindlicher als die Katze ($LD_{50} = 200 \text{ mg/kg/KGW}$) (UENO et al., 1974). Unter den Vögeln reagierten Entenküken nach subkutaner Injektion äußerst heftig. Als LD_{50} wurde 27 mg/kg/KGW (UENO, 1985) ermittelt. Beim Huhn betrug nach oraler Aufnahme die LD_{50} 140 mg/kg/KGW (HUFF et al., 1981). Tabelle 6 gibt die Toxizität von Deoxynivalenol gegenüber verschiedenen Tierarten je nach Art der Applikation wieder.

Nach HART und BRASELTON (1983) wirkt Deoxynivalenol weder mutagen noch karzinogen. KHERA et al. (1982) stellten jedoch fest, daß bei der trächtigen Maus nach oraler Aufnahme von $2,5 \text{ mg/kg}$ bis $5,0 \text{ mg/kg}$ DON/KGW an den Embryonen sowohl Eingeweide- als auch Skelettmißbildungen auftraten. MORRISSEY (1984) fütterte trächtige Ratten mit Deoxynivalenolhaltigem Futter ($0,5 \text{ mg/kg}$ - $5,0 \text{ mg/kg}$). Auch hier waren an den Embryonen Skelett- und Eingeweidemißbildungen zu verzeichnen.

6.2. Klinische Symptome

Als untere Grenze für eine DON-Vergiftung mit ausgeprägter klinischer Symptomatik wird beim Schwein eine Konzentration von $0,7 \text{ mg/kg}$ im Futter angesehen. Ab 300 mg/kg werden die Futterrationen verzögert auf-

Tabelle 6: LD₅₀-Werte von Deoxynivalenol

Tierart	Applikation	LD ₅₀ mg/kg	Literatur
Maus	i.p.	70	YOSHIKAWA und MOROOKA (1974)
Maus	oral	46	
Ratte	oral	40 - 70	HART und BRASELTON (1983)
Katze	s.c.	200	UENO et al. (1974)
Huhn	oral	140	HUFF et al. (1981)
Entenküken	s.c.	27	UENO (1985)

i.p.: intraperitoneal

s.c.: subcutan

genommen, oder die Schweine verweigern das Futter. Noch höhere Konzentrationen von Deoxynivalenol führen beim Schwein zu Schwächeanfällen, Zittern, Erbrechen, blutigem Kot und einer aus dieser Symptomatik resultierenden Gewichtsabnahme (TRENHOLM et al., 1983). Von einer um 20% reduzierten Futteraufnahme bei Ferkeln berichten FORSYTH et al. (1976) nach Vorlage von Pellets mit 3,6 mg DON/kg. Wie Abbildung 5 zeigt, stellen nach COTE et al. (1984) Fortpflanzungsstörungen (50%) und Futterverweigerung (43%) zentrale Symptome der Deoxynivalenol-Toxikose beim Schwein dar. Ausgewachsene Schweine sind toleranter gegen Deoxynivalenol als Ferkel. (CHAVEZ, 1984).

Natürlich mit 20 mg/kg DON kontaminierter Hafer verursachte bei Pferden eine zweitägige Futterverweigerung. Anschließend wurde der Hafer von den Tieren widerwillig aufgenommen. Zwei Monate später reduzierte sich das Allgemeinbefinden der Pferde, die Stuten wurden nicht mehr rossig (BAUER und GEDEK, 1980).

Das Allgemeinbefinden von Kälbern ist nach Aufnahme von Deoxynivalenol-haltigem Futter deutlich gestört. Die Jungtiere machen einen depressiven Eindruck und rollen die Augenlider zurück (ABRAMSON et al., 1983).

Bei Geflügel (Weiße Leghorn) hatte die Verfütterung von Deoxynivalenol-haltigem Mais (82,8 mg/kg) Durchfall, gestörtes Verhalten und Temperaturerhöhung zur Folge (LUN et al., 1986). Nach ABRAMSON et al. (1983) geht die Legeleistung nach Aufnahme von toxinhaltigem Futter um 15% bis 25% zurück, die braunschaligen Eier werden blasser.

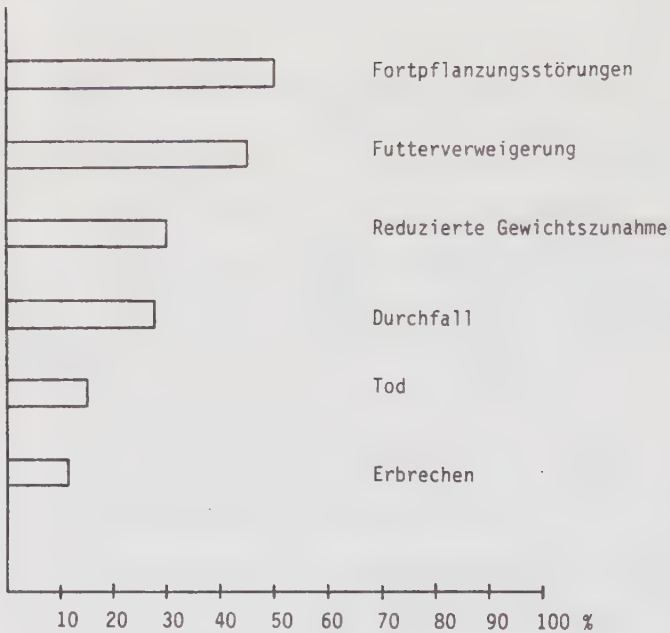
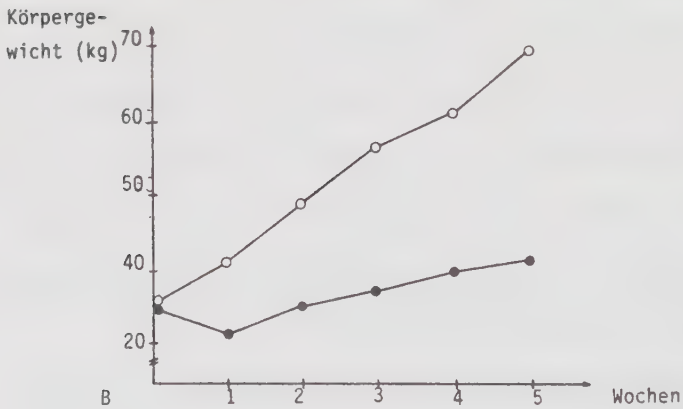
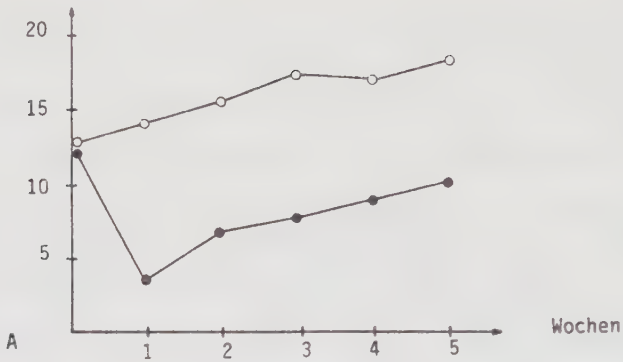


Abbildung 5 : Prozentuale Verteilung der Symptomatik beim Schwein
nach Aufnahme von Deoxynivalenol-haltigem Futter
nach COTE et al. (1984)
(Deoxynivalenol-Konzentration: 2,5 - 4,0 mg/kg)

FRIEND et al. (1983) fütterten 60 Yorkshireschweinen (durchschnittl. Gewicht: 29 kg) mit Deoxynivalenol-haltigen Pellets ad libitum. Das Futter der Versuchs- und Kontrollgruppe (je 30 Tiere) hatte einen Deoxynivalenol-Gehalt von 7,6 mg/kg bzw. 0,04 mg/kg. Wie aus Abbildung 6 zu entnehmen ist, reduzierte sich die Futteraufnahme bei Tieren mit Deoxynivalenol-haltiger Diät binnen einer Woche um 50%. Hieraus resultierten dann auch die schlechteren Gewichtszunahmen. COPPOCK et al. (1985) belasteten fünf weibliche Schweine (durchschnittl. Gewicht: 30,2 kg) mit 0,5 mg DON/kg intravenös. Abbildung 7 gibt den zeitlichen Ablauf einer akuten Deoxynivalenol-Toxikose wieder. Schon acht Minuten nach Applikation des Toxins begannen die Schweine zu würgen. Während der folgenden vier Stunden erbrachen die Tiere alle zwei bis 15 Minuten. Eine Stunde post injectionem erkrankten die Probanden an Durchfall. 24 Stunden nach Versuchsbeginn wurden die Tiere euthanasiert und pathologisch-anatomisch untersucht.

Daß auch im klinischen Bild einer Deoxynivalenol-Toxikose mit der pathognomonischen Symptomatik anderer Mykotoxine gerechnet werden sollte, beweist der oft geführte Nachweis von Zearalenon in positiven Deoxynivalenol-Proben (BAUER und GEDEK, 1980; TRENHOLM et al., 1983; COTE et al., 1984; HAGLER et al., 1984). Hierbei ist besonders an die östrogene Wirkung des Zearalenons zu denken. Beim Schwein treten dann Vulvaschwellung, Prolaps der Vagina und Gesäßgeschwellungen auf (ENDERS, 1984).

Futter (kg/Woche)



- Deoxynivalenol-haltiges Futter
- Deoxynivalenol-freies Futter

Abbildung 6 : Futterverwertung (A) und Gewichtszunahme (B) beim Schwein nach Fütterung von Deoxynivalenol-haltigem Futter (7,6 mg/kg) (FRIEND et al., 1984)

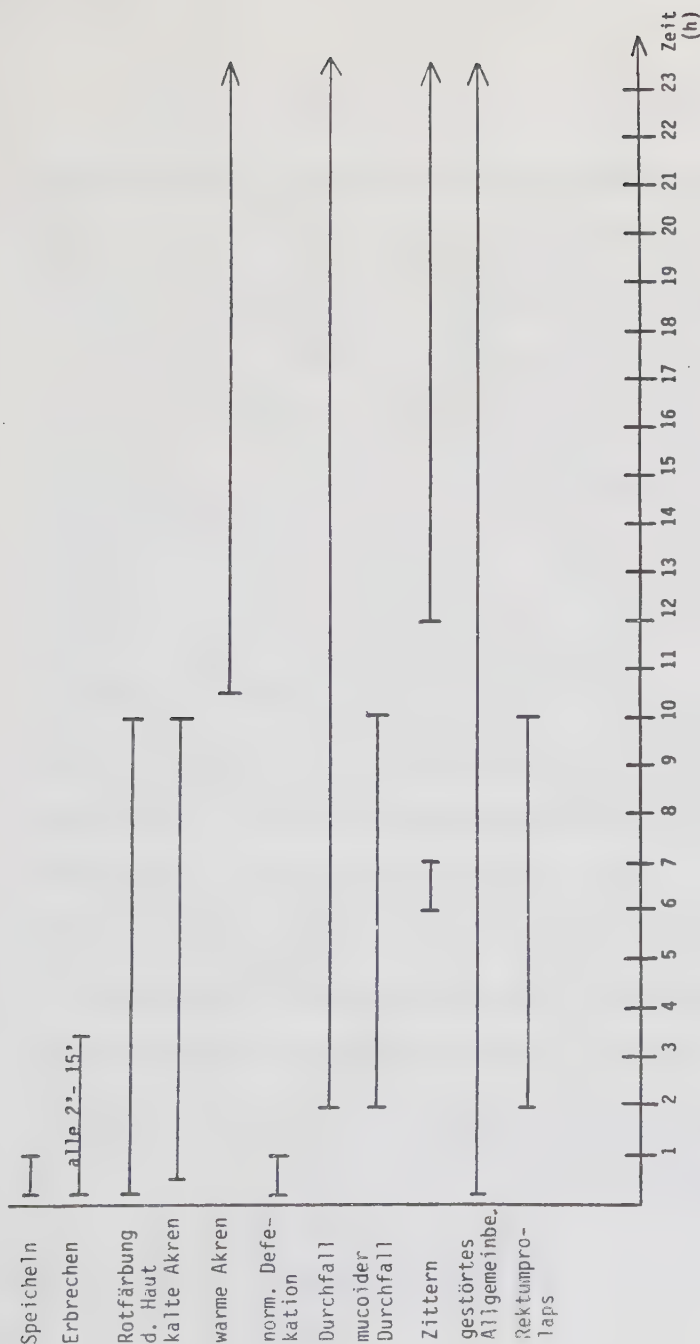


Abbildung 7 : Zeitlicher Verlauf der klinischen Symptome bei Schweinen nach i.v. Gabe von 0,5 mg Deoxynivalenol pro kg nach COPPOCK et al. (1985)

6.3. Pathophysiologische und pathohistologische Befunde

Aufgrund von zytologischen Untersuchungen können enge Wechselbeziehungen zwischen Fusarientoxinen und dem Zellstoffwechsel hergestellt werden. Trichothecene inhibieren durch kurzzeitige kompetitive Bindung an die ribosomalen S-60-Untereinheiten die Polypeptidtransferase. Hieraus resultiert eine Hemmung der Proteinbiosynthese (UENO et al., 1973; McLAUGHLIN et al., 1977). Eine negative Beeinflussung des immunologischen Systems mit Reduktion der Antikörperbildung, Abnahme der Stimulierbarkeit von B- und T-Lymphozyten, Leukopenie, Hypoplasie der Thymuszellen beim Jungtier, sowie Milz- und Lymphknotenhypoplasie sind Folgen einer chronischen Deoxynivalenol-Aufnahme (UENO et al., 1973; WISKOTT, 1978; LAFAGRE-FRAYSSINETT et al., 1979; TRYPHONAS et al., 1984). Die parenterale Aufnahme von Standardtoxin führte beim Schwein zu einer deutlichen Hypoglycämie. Eine Stunde post injectionem von 0,5 mg DON/kg sank der Blutglucosespiegel der Tiere auf 60 mg/dl (COPPOCK et al., 1985). Bei den histologischen Untersuchungen der von COPPOCK et al. (1985) mit DON belasteten Schweine waren im Bereich der Inselzellen des Pankreas Zellpyknoten, Karyorrhaxis und Zellnekrosen zu erkennen. Der B-Lymphozytengehalt der Mesenteriallymphknoten war reduziert; in den Harnblasen konnten nekrotische Zystitiden diagnostiziert werden. Legehennen, die Deoxynivalenol-kontaminierten Mais aufnahmen, zeigten nach dem Schlachten helle, blasse Lebern (65% der Tiere) und Fettlebern mit Hämorrhagien (33% der Tiere) (ABRAMSON et al., 1983).

6.4. Metabolismus

Beim Schwein beträgt die Halbwertszeit von Deoxynivalenol im Organismus 2,08 bis 3,65 Stunden. 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung von 0,5 mg Deoxynivalenol/kg konnten in den Nieren der Tiere noch 24 ng Deoxynivalenol/g nachgewiesen werden. Andere Organe wie Leber, Milz, Muskulatur und Lymphknoten waren frei von DON. Bei zwei in Stoffwechselkäfigen gehaltenen Schweinen wurden nach 10,1 Stunden bzw. 18,3 Stunden 97% der aufgenommenen Toxinmenge renal ausgeschieden (COPPOCK et al., 1985). POLLMANN et al. (1985) führten einen 42-tägigen Fütterungsversuch bei Schweinen durch. Wie aus Tabelle 7 zu entnehmen ist, wurden nach dem Schlachten die höchsten Toxinkonzentrationen in Milz und Nieren detektiert. Als wesentliche Metaboliten von DON wurden von PRELUSKY et al. (1986), YOSHIKAWA et al. (1986) und COTE et al. (1986) das deepoxidierte Deoxynivalenol DOM-1 (3 α ,7 β ,15-trihydroxytrichothec-9,12-diene-8-one) und an Glucuronsäure konjugiertes DON und DOM-1 beschrieben.

Beim Schaf wurde nach einmaliger intravenöser Gabe von 0,5 mg DON/kg ein Exkretionsmaximum nach 0,5 bis 1,5 Stunden post injectionem gemessen. 66,5% der applizierten DON-Dosis wurden wiedergefunden. Hiervon waren 63,0% im Harn (24,1% DON; 21,2% DON-Glucuronid; 0,5% DOM-1; 17,2% DOM-1-Glucuronid) und 3,5% in der Galle (nahezu ausschließlich DOM-1-Glucuronid). Im Kot wurden weder DON noch Metaboliten von DON nachgewiesen. Bei oraler Aufnahme von 5 mg DON/kg fanden sich 54 - 75% der Dosen in den Faeces und 7% im Harn (2,1% DON; 3,6% DON-Glucuronid; 0,06% DOM-1; 1,2% DOM-1-Glucuronid) und

Tabelle 7 : Deoxynivalenol-Konzentrationen (ng/g) in Organen vom Schwein nach Fütterung von artifiziell kontaminiertem Weizen (POLLMANN et al., 1985)

Organ	Deoxynivalenol-Konzentration im Futter		
	1,2 mg/kg	2,4 mg/kg	3,6 mg/kg
Leber	5	10	12
Milz	19	9	16
Herz	18	9	10
Niere	19	19	23

0,11% in der Galle (hauptsächlich DOM-1-Glucuronid) wieder (PRELUSKY et al., 1986).

Von Pansenmikroorganismen wird DON in vitro in DOM-1 metabolisiert (COTE et al., 1986). YOSHIZAWA und Mitarbeiter (1986) wiesen in der Milch und im Harn von mit DON-haltigen Futter ernährten Kühen DOM-1 nach.

7. Nachweisverfahren

Die Methoden zum Nachweis von Deoxynivalenol beruhen auf unterschiedlichen Verfahren: Im Mittelpunkt der Analysenmethoden stehen die physikalisch-chemischen Verfahren (SCOTT et al., 1981; CHANG et al., 1984; EHRLICH und LEE, 1984). Im Unterschied zu den anderen Trichothecen (T-2 Toxin, HT-2 Toxin etc.) treten biologische Testmodelle wegen der geringen Spezifität eher in den Hintergrund (BURMEISTER et al., 1980). Auch wegen der sehr niedrigen Nachweisgrenzen der biologischen Testsysteme ist den physikalisch-chemischen Methoden der Vorzug zu geben.

Die Analyse von DON besteht prinzipiell aus fünf Teilschritten von gleicher Bedeutung:

- Extraktion
- Anreicherung
- Trennung
- Identifizierung
- quantitative Bestimmung

Als Extraktionsmittel finden organische Lösungsmittel Anwendung. Die Anreicherung, bei der der Rohextrakt von Störsubstanzen befreit wird, erfolgt in der Regel durch Flüßig-Flüßig-Trennung oder durch Säulenchromatographie. Die gebräuchlichsten Methoden für die zumeist mit der Identifizierung verbundene Trennung sind Dünnschichtchromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie.

7.1. Extraktions- und Reinigungsmethoden

Bei der Extraktion wird eine gemahlene, repräsentative Futterprobe in der Regel so behandelt, daß mehrere Trichothecene erfaßt werden können (ROMER et al., 1978; KAMIMURA et al., 1981; BATA et al., 1983). Bei der Multitoxinanalytik wird angestrebt neben den strukturverwandten Trichothecenen auch noch weitere Mykotoxine wie Aflatoxine, Ochratoxine und Zearalenon zu extrahieren (EHRlich und LEE, 1984; HAGLER et al., 1984). Das dabei zu beobachtende verschiedenartige Lösungsverhalten der einzelnen Toxine ist bedingt durch die unterschiedliche Zahl an funktionellen Gruppen. Wegen der zahlreichen Hydroxygruppen läßt sich Deoxynivalenol mit höher polaren Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril oder Mischungen dieser Substanzen mit Wasser extrahieren (TRUCKSESS et al., 1983). Mit diesen Lösungsmitteln lassen sich auch andere Trichothecene wie

T-2 Triol und Nivalenol gewinnen. Weniger stark polare Lösungsmittel (Chloroform, Ethylacetat, Aceton) eignen sich für T-2 Toxin, Neosolaniol und Diacetoxyscirpenol (PATHRE und MIROCHA, 1977). Um eine möglichst große Zahl von Trichothecenen zu erfassen, ist für die meisten Verfahren eine Methanol/Wasser-Mischung das Extraktionsmittel der Wahl. Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, werden nahezu 50% der Proben mit diesem Gemisch extrahiert. 25% der Proben werden mit Chloroform/Wasser behandelt.

Vor dem eigentlichen Toxinnachweis wird eine Reinigungsphase eingeschoben. Eine falsche Beurteilung des Probenmaterials wird dadurch gemindert, da die Probe von Störsubstanzen (Futterfarbstoffen) weitgehend befreit wird (EPPLEY, 1979; BAUER, 1980). Diese Reinigung kann durch Dialyse, Ausschütteln mit apolaren Lösungsmitteln (z.B. Hexan) oder Säulenchromatographie erfolgen (ROMER et al., 1978; TRUCKSESS et al., 1983). In Tabelle 9 sind die wichtigsten Säulenmaterialien und Elutionsmittel für die Deoxynivalenol-Aufreinigung zusammengestellt.

Tabelle 8 : Übersicht über die Extraktionsmittel für die Deoxynivalenol aus unterschiedlichen Substraten

Extraktionsmittel	Mischungs- verhältnis (Menge)	Substrat Probenmenge / Extraktionsdauer	Erfafte Mykotoxine	Wieder- findungs- rate (%)	Literatur
Methanol/Wasser	1 + 1 (250 ml)	Mais (50 g / 30 min)	DON	77 - 86	BENNETT et al. (1983)
Methanol/Wasser	8 + 2 (2000 ml)	Mais (1000 g / 60 min)	DON	n.a.	BENNETT et al. (1981)
Methanol/Wasser	95 + 5 (200 ml)	Mischfuttermittel (100 g / 30 min)	DON, DAS, NEO, n.a. T-2, HT-2, BUT, MON, ZEA		KAMIMURA et al. (1981)
Methanol/Wasser	95 + 5 (200 ml)	Kleie (20 g / n.a.)	DON, NIV	n.a.	BLAAS et al., (1984)
Methanol/Wasser	6 + 4 (250 ml)	Müllereiprodukte (50 g / 5 min)	DON	85	HART und BRASELTON (1983)
Methanol/Wasser	1 + 1 (250 ml)	Mais, Weizen (50 g / 30 min)	DON	54 - 83	SCOTT et al. (1981)

Fortsetzung Tab. 8:

Extraktionsmittel	Mischungs- verhältnis (Menge)	Substrat Probenmenge / Extraktionsdauer	Erfaßte Mykotoxine	Wieder- findungs- rate (%)	Literatur
Methanol/Wasser	6 + 4 (600 ml)	Mais (300 g / n.a.)	DON	n.a.	VESONDER et al. (1978)
Methanol/Wasser	6 + 4 (200 ml)	Weizen (50 g / 120 min)	DON, ZEA, T-2	n.a.	BATA et al. (1983)
Ethylacetat	200 ml	(50 g / 120 min)	HT-2, DAS, Fus-X		
Ethylacetat	50 ml	Milch (40 ml / n.a.)	DON, DON-1	82	SWANSON et al. (1986)
Chloroform/Ethanol	4 + 1 (n.a.)	Kultur (n.a. / n.a.)	DON, AcDON, ZEA	n.a.	BLACKWELL et al., (1985)
Chloroform/Ethanol	8 + 2 (200 ml)	Weizen, Hafer (10 g / 30 min)	DON	87	COHEN und LAPOINTE (1982)
Chloroform/Wasser	6 + 4 (100 ml)	Kultur (n.a. / 30 min)	DON, ZEA	n.a.	GREENHALGH et al. (1983)

Fortsetzung Tab. 8:

Extraktionsmittel	Mischungs- verhältnis (Menge)	Substrat Probenmenge / Extraktionsdauer	Erfafte Mykotoxine	Wieder- findungs- rate (%)	Literatur
Chloroform/Wasser	250 + 25 (275 ml)	Weizen, Hafer, Mais (n.a. / 30 min)	DON, ZEA	n.a.	PLATTNER und BENNETT (1983)
Chloroform/Ethanol	8 + 2 (100 ml)				
Acetonitril/Wasser	1 + 1 (250 ml)	Gewebe, Futtermittel, Nahrungsmittel (50 g / n. a.)	DON, DAS, T-2	54 - 83	STAHR et al., (1979)
Acetonitril/Wasser	84 + 16 (200 ml)	Weizen (50 g / 30 min)	DON	n.a.	EPPLEY et al. (1984)
Acetonitril/Wasser	84 + 16 (100 ml)	Gewebe (50 g / 30 min)	DON	81	EL-BANNA (1983)

DON : Deoxynivalenol AcDON : Acetyldeoxynivalenol ZEA : Zearalenon
DAS : Diacetoxystirpenol T-2 : T-2 Toxin HT-2 : HT-2 Toxin
NEO : Neosolaniol BUT : Butenolide MON : Moniliformin
DOM-1 : deepoxidierter DON Fus X : Fusarenon X n.a. : nicht angegeben

Tabelle 9 : Säulenchromatographische Aufreinigungsverfahren für Deoxynivalenol

Trenn- material	Menge (g)	Waschen	Säulenlänge (cm) u. Innendurch- messer (cm)	Elutionsmittel	Literatur
Kieselgel	7	Benzol (20 ml)	10 x 1	Benzol/Aceton (1+1) 20 ml	BATA et al. (1983)
Kieselgel	2	Aceton/Toluol (5+95) 30 ml	27 x 1,3	Methylenchlorid/Me- thanol (95+5) 30 ml	SCOTT et al. (1981)
Florisil	4	Aceton/Toluol (5+95) 100 ml	n.a.	Methylenchlorid/ Methanol (95+5) 50 ml	BLACKWELL et al. (1985)
Florisil	10	n.a.	20 x 1,5	Chloroform/Methanol (9+1) 100 ml	KAMIMURA et al. (1981)
SepPak C18	-	Methanol 2 ml Wasser 5 ml	---	Methanol (80%) 2 ml	MIROCHA et al. (1983)
Aluminium- pulver	0,5	n.a.	5 x 1	Acetontrifl/Wasser (84+16) 10 ml	TRUCKNESS et al. (1983)
Aktivkohle	0,7				
Celite	0,3				

7.2. Physikalisch-chemische Trenn- und Nachweisverfahren

7.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Vorgereinigte Proben werden bei der Dünnschichtchromatographie mittels Mikropipette auf eine beschichtete Glasplatte (stationäre Phase) aufgetropft. EPPLEY et al. (1984) trugen 5 g Probenaliquot pro Spot auf. Dies entspricht einer Menge von 25 μ l Auftrageflüssigkeit. Durch geeignete Fließmittel (mobile Phase) werden die Probenextrakte aufgetrennt. In Abhängigkeit von stationärer Phase, mobiler Phase und den Laborbedingungen (Temperatur, Luftfeuchte, Lichteinfall) ergeben sich für jede Substanz unterschiedliche Rf-Werte (Rf-Wert: Laufweite der Substanz im Verhältnis zur Laufweite der Fließmittelfront; gemessen ab dem Probenauftragepunkt). Der Nachweis von Deoxynivalenol erfolgt nach Entwicklung der DC-Platte durch Vergleich mit dem Standardtoxin. Zur Absicherung der Ergebnisse wird mit internem Standard gearbeitet. Um eine Überlagerung der Toxine durch Störsubstanzen zu vermeiden, kann eine zweidimensionale DC durchgeführt werden. Durch die unterschiedliche Polarität der beiden Fließmittel ist eine bessere Probenaufbereitung gewährleistet (BAUER, 1980).

In Tabelle 10 sind die dünnschichtchromatographischen Bedingungen für den DON-Nachweis aufgezeigt. Die Identifizierung erfolgt nach Derivatisierung. Diese wird in den meisten Fällen mit Aluminiumchlorid oder Schwefelsäure vollzogen (TAKITANI et al., 1979; HART und BRASELTON, 1983). Eine Auswertung der DC-Platte unter UV-Licht läßt Deoxynivalenol als blauen Spot erscheinen. Parallel zu DON

Tabelle 10 : Dünnschichtchromatographische Bedingungen für den Nachweis von Deoxynivalenol

Stationäre Phase	Mobile Phase	Rf-Wert	Derivatisation	Farbe nach Derivatisation	Probenmaterial Auftragemenge/ Nachweisgrenze	Literatur
Kieselgel 60	EAc/Eteth. 1:1	0,60	AlCl_3 7°/120°C	UV 365 nm hellblau	Weizen (5 g - 0,2 µg/g)	EPPLEY et al. (1984)
Kieselgel 60 (Whatman LHP-TLC)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 3 2 90+10+2	n. a.	H_2SO_4 (50%) 5°/100°C	n. a.	Müllereiprodukte (n. a. - 0,05 µg/g)	HART und BRASELTON (1985)
Kieselgel 60	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:1 CHCl_3/Ac 3:2	0,51	AlCl_3 (20%) 10°/110° NBP	UV 265 nm hellblau	Reis, Hafer, Weizen (n. a. - 0,05 µg/g)	ICHINOE et al. (1983)
Kieselgel 60	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 93+7	0,22	AlCl_3 (20%) 10°/110°	UV 365 nm blau	Cerealien, Futter- mittel (5 g - 0,05 µg/g)	KAMIMURA et al. (1981)

Fortsetzung Tab. 10:

Stationäre Phase	Mobile Phase	Rf-Wert	Derivatisation	Farbe nach Derivatisation	Probenmaterial Auftragemenge/ Nachweisgrenze	Literatur
Kieselgel 60	1. Dim.: CHCl ₃ /MeOH 93:7	n. a.	AlCl ₃ (20%) 15°/110 °C	UV 365 nm n. a.	Lebensmittel (0,5 g - 10 µg/kg)	BLAAS et al. (1984)
	2. Dim.: Tol/Eth 70+130					
Kieselgel 60	CHCl ₃ /MeOH 97+3	0,60	Nicotinamid 15°/160 °C	UV 360 nm	Standardtoxin (20 - 50 ng/Spot)	SANO et al. (1982)
			Acetylpyridin 30°/20 °C			
			Ameisensäure 4°/100 °C			
Kieselgel 60	Tol/EAc/Ac 9:2:1 CHCl ₃ /Ac/Prop. 85:10:5	0,15 0,38	Anisaldehyd 20°/100 °C	UV 360 nm gelb-rötlich sichtb. Licht gelb	Futter- und Nahrungsmittel (4,1 g - 0,1 g)	STAHR et al. (1979)

Fortsetzung Tab. 10:

Stationäre Phase	Mobile Phase	Rf-Wert	Derivatisation	Farbe nach Derivatisation	Probenmaterial Auftragemenge/ Nachweisgrenze	Literatur
Kieselgel 60	CHCl ₃ /MeOH 9:1	0,57	NBP (1%) 30°/150 °C	n.a.	Standardtoxin (0.05 µg/Spot)	TAKITANI et al. (1979)
	Benzol/Ac 1:1	0,51		blau		
	EAc/Hexan 5:1	0,34	TEPA (10%)			
	CHCl ₃ /Ac 3:2	0,44				
Kieselgel 60	CHCl ₃ /MeOH 8:2	0,60	Anisaldehyd 10°/110 °C	sichtbar gelb	Mais	VESONDER et al. (1978)
EAC : Ethylacetat			Éth : Ethanol			
Eteth : Ethylether			Prop : Propanol			
MeOH : Methanol			TEPA : Tetraethylpentamin			
NBP : Nitrobenzpyridin			Ac : Aceton			
Tol : Toluol			n.a. : nicht angegeben			

können mittels DC-Methode gleichzeitig weitere Mykotoxine aus Futtermitteln nachgewiesen werden (KAMIMURA et al., 1981; EHRLICH und LEE, 1984).

7.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analog zur DC-Methode erfolgt bei der HPLC-Analytik die Trennung der Substanzen durch eine Verteilung über eine stationäre und eine flüssige Phase. Optimale Trennungsergebnisse werden bei einer sehr feinkörnigen ($1\text{ }\mu\text{m}$ - $10\text{ }\mu\text{m}$) stationären Phase erreicht. Die mobile Phase wird dann mit hohem Druck durch die Säule gepreßt. Nach einer für jede Verbindung charakteristischen Retentionszeit wird die Probe durch einen Detektor (UV) analysiert (MEYER, 1980). Schnelle Analytik und hohe Automatisierung bei großem Probenumfang sind die Vorteile der HPLC-Analyse bei Mykotoxinproben (MAJERUS und WOLLER, 1984). Eine weitere Möglichkeit der HPLC ist die Gradientenelution: Die Analyse beginnt unter isokratischen Bedingungen. Diese sind so zu wählen, daß sich die nachzuweisenden Komponenten am Säuleneingang anreichern. Nachdem sich eine genügende Menge auf der Chromatographiesäule befindet, wird das Elutionsmittel derart variiert, daß die konzentrierten Probenbestandteile zu bestimmten Retentionszeiten von der Säule eluiert und anschließend detektiert werden (KAISER, 1979).

Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, besteht die mobile Phase bei der DON-Analytik meist aus einem Methanol/Wasser Gemisch. Die Nachweis-

Tabelle 11 : HPLC-Bedingungen für den Nachweis von Deoxynivalenol

Stationäre Phase (Körnergröße)	Mobile Phase	Flußgeschwindigkeit	Retentionszeit	Detektor	Probenmaterial (Einspritzmenge)	Nachweisgrenze (µg/kg)	Literatur
Li-ChrosorbRP18 (5 µm)	MeOH/H ₂ O 80:20	0,8 ml/min	7,80'	UV 224 nm UV 400 nm	Weizen (0,35 g)	n.a.	POLLMANN et al. (1985)
Li-ChrosorbRP18 (10 µm)	MeOH/H ₂ O 75+25	1 ml/min	9,80'	UV 224 nm	Mais, Reis (n.a.)	15	GREENHALGH et al. (1983)
Li-ChrosorbRP18 (10 µm)	MeOH/H ₂ O 75+25	1 ml/min	10,0'	UV 224 nm	Kulturextrakt (n.a.)	n.a.	MILLER et al. (1983)
Li-ChrosorbRP18 (10 µm)	CH ₃ Cl/MeOH 92:8	2 ml/min	2,85'	UV 254 nm	Mais (n.a.)	n.a.	VESONDER et al. (1982)
PerlsorbRP18 (30 - 40 µm)	AcN/H ₂ O 1,5+8,5	1,5 ml/min	3,30'	UV 214 nm	Getreidestaub (n.a.)	10	EHRLICH und LEE (1984)
C ₁₈ -10 Säule (10 µm)	AcN/H ₂ O 50:50	5 µl/min	7,30'	MS UV 225 nm	Cerealien (n.a.)	5 - 10	TIEBACH et al. (1985)

Fortsetzung Tab. 11:

Stationäre Phase (Körnergröße)	Mobile Phase	Flußgeschwindigkeit	Retentionszeit	Detektor	Probenmaterial (Einspritzmenge)	Nachweisgrenze ($\mu\text{g/kg}$)	Literatur
Bondapak C18 (n.a.)	MeOH/H ₂ O 90:10	1,5 ml/min	n.a.	UV 224 nm	Mais (n.a.)	n.a.	BENNETT et al. (1981)
Perkin-Elmer RP18 (10 μm)	AcN/MeOH/H ₂ O 10:10:80	2 ml/min	3,29'	LC-75 Spektrometer	Cerealien (n.a.)	10	KING et al. (1984)

AcN : Acetonitril MS : Massenspektrometer
 MeOH : Methanol n.a. : nicht angegeben

grenzen für Deoxynivalenol beim HPLC-Nachweis liegen zwischen 5 µg/kg und 15 µg/kg Probe (GREENHALGH et al., 1983; TIEBACH et al., 1985).

7.2.3. Gaschromatographie (GC)

Die Trennung der Substanzen erfolgt bei der GC in einer 15 m - 30 m langen Trennsäule. Diese wird vom Trägergas (Helium, Stickstoff, Wasserstoff) durchspült. Der Toxinnachweis wird mittels Flammenionisationsdetektor (FID), Elektroneneinfangdetektor (ECD) oder Massenspektrometrie (MS) geführt (Tab. 12).

Bei der MS-Analyse werden die Substanzen mit Elektronenbeschuß oder chemischer Ionisation mit Reaktandgasen ionisiert. Neben den Molekülen entstehen die charakteristischen Massenfragmente. Mittels MS kann Deoxynivalenol eindeutig identifiziert werden und von anderen Molekülen abgegrenzt werden (BENNETT et al., 1983; HAGLER et al., 1984).

Bei der GC erfolgt in Abhängigkeit von Temperatur, Säulenart, Trägergas und Flußgeschwindigkeit des Trägergases der Nachweis des Toxins durch Vergleich der Retentionszeit mit dem Standardtoxin (GAREIS, 1982). Analog zur DC und HPLC wird ein quantitativer Nachweis durch Vergleich der Peakhöhen und Peakflächen von Standardtoxin und Probe (IKEDIOBI et al., 1971).

Die freien Hydroxygruppen von Deoxynivalenol müssen vor der GC-Analyse derivatisiert werden. Die verschiedenen Möglichkeiten und Bedingungen dieser Derivatisation sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 12 : GC-Bedingungen für den Nachweis für Deoxynivalenol

Säule	Derivati- sierung	Injektions- temperatur	Ref.Zeit	Detektor	Probenmaterial (Einspritzmenge)	Nachweisgrenze	Literatur
SE-54 (30mx0,25mm)	HFBI	100 °C	18,35'	ECD/MS	Weizen, Hafer, Gerste (0,5 g)	0,05 mg/kg	COHEN und LAPOINTE (1982)
SE-54 (12mx0,25mm)	HFBI	160 °C	n.a.	ECD/MS	Urin, Galle (n.a.)	20 mg/ml Urin 40 ng/ml Galle	PRELUSKY et al. (1986)
I DB-5 (10mx0,32mm)	TMS	80 °C	n.a.	FID/MS	Weizen (n.a.)	5 - 10 µg/kg	TIEBACH et al. (1985)
I DB-5 (10mx0,32mm)	TMCS	80 °C	16,45'	MS	Cerealien, Lebensmittel (n.a.)	0,010 µg/g	BLAAS et al. (1984)
SE-52 (12mx0,25mm)	BSTFA	180 °C	n.a.	FID	Mais (n.a.)	n.a.	BATA et al. (1983)
CP SIL 5 CB (25mx0,22mm)	n.a.	150 °C	13,2'	MS (SIM)	Brot (n.a.) m	n.a.	GREENHALGH et al. (1984)

Säule	Derivati- sierung	Injektions- temperatur	Ref. Zeit	Detektor	Probenmaterial (Einspritzmenge)	Nachweisgrenze	Literatur
3% OV-3 (183cmx2mm)	HFBI	180°C	6,5'	MS (SIM)	Hühnergewebe Eier	0,010 µg/g	EL-BANNA (1983)
3% SE-30 (1mx2mm)	TSIM/TMCS	220°C	n.a.	MS	Weizen (n.a.)	0,05 mg/kg	TRENHOLM et al. (1983)
3% OV-3 (183cmx2mm)	HFBI	170°C	5 - 6,5'	ECD/MS	Weizen (0,1 g)	0,003 µg/g	SCOTT et al. (1981)
3% OV-3 (183cmx2mm)	HFBI	170°C	5,5'	ECD	Weizen (0,19 g)	n.a.	FRIEND et al. (1984)
3% OV-101 (1,80x2mm)	HFBI	160°C	n.a.	ECD	Weizen (n.a.)	n.a.	BENNETT et al. (1983)
2% OV-17 (2mx3,2mm)	TMS	250°C	2,6'	ECD	Cerealien (0,1 g)	2,0 µg/kg	KAMIMURA et al. (1981)
3% OV-17 (1,8mx2mm)	TMS	220°C	2,2' DOM-1 3,1' DON	ECD	Milch (4 µl)	n.a.	SWANSON et al. (1986)

Fortsetzung Tab. 12:

Säule	Derivati- sierung	Injektions- temperatur	Ref. Zeit	Detektor	Probenmaterial (Einspritzmenge)	Nachweisgrenze	Literatur
1% OV-17 (1mx2mm)	TMS	200 °C	5,2' DON 3,2' DOM-1	ECD/MS	Blut/Urin (n.a.)	n.a.	YOSHIZAWA et al. (1986)
3% OV-17 (1mx3mm)	TMS	190 °C	n.a.	ECD	Weizen (n.a.)	n.a.	HAGLER et al. (1984)
3% OV-101 (1.82mx2mm)	TMS	160 °C	11.81'	FID/MS	Mais (n.a.)	0.07 µg/kg	VESONDER et al. (1978)
3% OV-1 (2mx4mm)	TMS	150 °C	n.a.	FID/MS	Mais (n.a.)	n.a.	VISCONTI und PALMISANO (1982)
3% OV-17 (n.a.)	MBTFA	170 °C	n.a.	MS	Reis, Mais (0.2 g)	n.a.	MIROCHA et al. (1983)
10% OV-101 (n.a.)	n.a.	n.a.	22'	MS	Mischfutter, Lebensmittel, Gewebe (n.a.)	n.a.	STAHR et al. (1979)

Legende zur Tabelle 12:

ECD : Elektroneneinfangdetektor
SIM : Selected Ion Monitoring
TMS : N- Trimethylsilylimidazol
FID : Flammenionisationsdetektor
DON : Deoxynivalenol
DOM-1: Deepoxidiertes Deoxynivalenol
HFBI : N-Heptafluorobutyrylimidazol
MS : Massenspektrometer
TMCS : Trimethylchlorosilan
MBTFA: Methyl-bis trifluoroacetamid
BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)-tri-
fluoroacetamid

Tabelle 13 : Derivatisierungsbedingungen von Deoxynivalenol
für die gaschromatographische Analyse

Reagenz	Behandlung	weitere Aufbereitung	Literatur
BSTFA (100 µl)	15' / 60 ⁰	-	BATA et al. (1983)
HFBI (50 µl)	60' / 60 ⁰	Toluol/Aceton (95+5) 500µl 5% Bicarbonatlsg. 1000µl	SCOTT et al. (1981)
DMF (50) HMDS(40) TMCS(10) (1000 µl)	30' / 60 ⁰	Wasser (3000 µl)	BLAAS et al. (1984)
TMS (1) TMCS(0,2) Ethylacetat(9) (500 µl)	15' / 25 ⁰	-	KAMIMURA et al. (1981)
BSTFA (100 µl)	60' / 90 ⁰	-	ROSEN und ROSEN (1982)
TMS (50) TMCS(50) (100 µl)	60' / 60 ⁰	-	TRENHOLM et al. (1983)
MBTFA (n.a.)	n.a.	-	MIROCHA et al. (1983)
BSTFA(4) TMCS(1) (100 µl)	60' / 80 ⁰	-	KIENTZ und VERWEIJ (1986)

BSTFA : N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid

DMF : Dimethylformamid

HFBI : N-Heptafluorobutyrylimidazol

HMDS : Hexamethyldisilazan

TMS : N-Trimethylsilylimidazol

MBTFA : Methyl-bis-trifluoroacetamid

TMCS : Trimethylchlorosilan

n. a. : nicht angegeben

7.3. Weitere Nachweisverfahren

Biologische Testmechanismen kommen für Deoxynivalenol, im Unterschied zu anderen Trichothecenen (z.B. T-2 Toxin), wegen ihrer geringen Spezifität und großen Varianz nur bedingt in Frage.

PATHRE und MIROCHA (1977) berichteten über eine hemmende Wirkung der Trichothecene auf das Auskeimen von Sämlingen.

Die Larven des Salzwasserkrebsses *Artemia salina* reagieren hochempfindlich gegen Trichothecene. Nach EPPLEY (1974) liegt für zehn ausgetestete Trichothecene die LD₅₀ der Larven zwischen 0,04 µl und 0,4 µl/ml.

Nach GEDEK (1972) kann in die Luftkammern von befruchteten Hühnereiern ein, in einem Lösungsvermittler (Dimethylsulfoxid) und Wasser gelöster, Rohextrakt eingegeben werden. Nach 14-tägiger Bebrütung der Eier wird der Versuch anhand der Embryonensterberate ausgewertet (CHI-Quadratstest). Die Nachweisgrenze liegt bei diesem Test bei 10 µg Deoxynivalenol/Ei.

In der Zellkultur (BEL-Zellen) liegt die Nachweisgrenze für DON bei 5 µg/ml.

Beim Hauttoxizitätstest (Meerschweinchen) können Konzentrationen über 50 µg/Spot als positiv beurteilt werden (GAREIS, persönl. Mitteilungen).

C Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1. Biologisches Material

Zur Untersuchung auf DON kamen 103 Futtermittelproben und vier Lebensmittelproben. Die Futtermittelproben teilten sich auf in

- 31 Haferproben
- 25 Weizenproben
- 18 Gersteproben
- 15 Maisproben
- 14 Mischfutterproben

Hafer, Weizen, Gerste und Mais wurden vom Tiergesundheitsdienst Grub zur Verfügung gestellt*. Die Proben stammten von der Ernte 1985 und wurden in landwirtschaftlichen Betrieben der Regierungsbezirke Oberbayern und Niederbayern gezogen.

Die 14 Mischfutterproben wurden dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät zur routinemäßigen mykotoxikologischen Untersuchung zugesandt. Die Proben kamen aus Betrieben verschiedener Mischfutterhersteller der Bundesrepublik Deutschland.

Bei den Nahrungsmittelproben (Schwarzbrot, Weißbrot, Brötchen, Gebäck) handelte es sich um Verdachtsproben. Sie wurden vom Fachbereich Veterinärmedizin und Lebensmittelchemie** des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, München, gestellt.

* Für die Zusammenarbeit möchte ich mich bei Herrn Richter, Grub, bedanken.

** Für die Zusammenarbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. Berndl, München, bedanken.

1.2. Technisches Material

1.2.1. Toxinstandard

Als Standardsubstanz diente Deoxynivalenol (SIGMA, München, D 2651). Die Identität und Reinheit wurde im Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- u. Seuchenmedizin massenspektrometrisch überprüft. Die Konzentration der mit Methanol hergestellten Stammlösung betrug 200 µg/ml.

1.2.2. Chemikalien

1.2.2.1. Extraktions- und Lösungsmittel

Sämtliche verwendeten Extraktions- und Lösungsmittel hatten p.a. Qualität. Im Folgenden sind die einzelnen Artikelnummern der Fa. MERCK in Klammern angegeben. Bei Chemikalien die nicht von der Fa. MERCK stammen, sind die Bezugsfirmen ebenfalls in Klammern beige-fügt.

1.2.2.2. Derivatisationsmittel

Die Chemikalien für die Derivatisierung von Deoxynivalenol auf der DC-Platten stammten von der Fa. MERCK (Näherer Angaben: vergl. 2.2.1.2.). Für die Derivatisation bei der Gaschromatographie fanden zwei Reagenzien Verwendung:

- N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) (PIERCE CHEMICAL COMPANY Nr. 49701)
- Tri-Sil /TBT (PIERCE CHEMICAL COMPANY Nr. 49016)

1.2.3. Geräte zur Analytik

1.2.3.1. Säulenchromatographie

Zur Anwendung kamen 20 ccm Plastikeinwegspritzen (BRAUN-MELSUNGEN Nr. 460620/5) mit einem Innendurchmesser von 2,0 cm und einer Höhe von 8,7 cm. Nach dem Packen der als Chromatographiesäulen fungierenden Spritzen wurden diese auf ein Vakuumgerät (AASP, VAC-ELUT Nr. AI 6000) montiert.

Andere Aufreinigungsverfahren konnten mit Glassäulen (30 cm x 1,2 cm) und C-18 Fertigsäulen (POND-ELUT Nr. 607111) durchgeführt werden.

Als weitere Geräte für die Aufreinigung der Proben wurden benötigt:

- Laborrüttler (BÖHLER SM)
- Ultraschallbad (BRANSON EUROPA, Branson B 12)
- Rotationsverdampfer (BÜCHI, Rotavapor R-110)

1.2.3.2. Dünnschichtchromatographie

Bei der DC-Analytik wurde mit Fertigplatten Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator (0,25 mm Schichtdicke) (Art. 5721) und HPTLC 60 F 254 Fertigplatten mit Konzentrierungszone (Art. 13727) gearbeitet. Folgende Geräte kamen für die DC-Analytik noch zur Verwendung:

- Trennkammern (DESAGA) 100 x 200 x 200 cm
- DC-Auftragegestell mit Rahmen (CAMAG)
- Sprühkabinett (CAMAG)
- DC-Scanner (CAMAG Nr. 76 502)
- UV-Betrachter (CAMAG)
- Potentiometerschreiber (METHROHM, Labograph E 586)
- Auftragegerät für präparative DC (CAMAG)
- Plattenerhitzer (CAMAG)

1.2.3.3. Gaschromatograph mit Flammenionisation (GC-FID)

Die gaschromatographischen Analysen wurden mit einem Gaschromatograph der Fa. CARLO ERBA durchgeführt. Das Gerät (Fractovap 4200) wurde mit einer DB-5 Fused Silica Kapillar Säule (15 m x 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 μ m) bestückt (ICT Handelsgesellschaft Nr. 122-5012).. Der Nachweis des Toxins erfolgte mittels FID. Diagrammzeichnung und Integration konnten mit einem Mega Serie Integrator (CARLO ERBA) vorgenommen werden.

1.2.3.4. Gaschromatograph-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Identität von Deoxynivalenol-TMS wurde durch massenspektrometrische Analysen mit einem GC-MS-System (FINNIGAN MAT, Bremen, 1020) bestimmt, wobei die GC-Parameter den oben beschriebenen entsprachen. Das Massenspektrum von DON-TMS wurde bei chemischer Ionisation in Methan

(0,4 Torr) aufgenommen. Das Quadrupol-Massenfilter wurde so eingestellt, daß entweder das komplette Spektrum von DON-TMS oder selektive Ionen (SIM, Selected Ion Monitoring) registriert wurden.

2. Methoden

2.1. Vorversuche

In Vorversuchen wurden die geeigneten Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung von Deoxynivalenol ausgetestet.

2.1.1. Extraktionsmittel

Folgende Extraktionsmittel wurden getestet:

- Acetonitril/Wasser 168 + 32
- Acetonitril (Art. 800015) 200
- Methanol (Art. 6009)/Wasser 100 + 100

Mit je 200 ml Extraktionsflüssigkeit wurden artifiziell kontaminierte Maisproben (NEUFORM^R; je 50 g) 30 min extrahiert. Folgende Konzentrationen von Deoxynivalenol waren zu erwarten: 0,15 µg/g; 0,30 µg/g; 0,5 µg/g; 1,00 µg/g.

2.1.2. Aufreinigung der Rohextrakte

Nach der Filtration der artifiziell kontaminierten Maisgrießproben

erfolgte eine Aufreinigung des gewonnenen Rohextraktes. Hierbei wurden zwei Methoden getestet:

Verfahren nach ROMER et al. (1978), modifiziert nach GAREIS (1982):

- 60 ml Filtrat + 240 ml Ammoniumsulfatlösung (Art. 1217);
30 s schütteln,
- 100 g Hyflo Super Cel (SERVA, Nr. 25960) zugeben, 30 s
schütteln,
- Filtration,
- Scheidetrichter mit 100 ml Ethylacetat (Art. 9623) ausschütteln,
- über 30 g wasserfreies Natriumsulfat (Art. 6649)
filtrieren.

Eine weitere Methode zur Rohextraktaufreinigung wurde nach TRUCK-SESS et al. (1983) durchgeführt:

- 20 ml Filtrat + 50 ml n-Hexan (Art. 4367) im Scheidetrichter 3 min ausschütteln,
- Hexanphase verwerfen.

2.1.3. Säulenchromatographische Aufreinigung

Bei der Säulenchromatographie wurden die in 2.1.1. beschriebenen artifiziell kontaminierten Maisgrießproben und Standardtoxin über verschiedene Säulen gegeben. Drei Methoden wurden auf ihre Verwendbarkeit überprüft:

Verfahren nach ROMER et al. (1978), modifiziert nach GAREIS (1982):

Zur Verwendung kamen hier die in 1.2.3.1. beschriebenen Glassäulen.

- Säulenfüllung :
- 0,5 g wasserfreies Natriumsulfat
 - 2,0 g Kieselgel 60, Korngröße 70-230 mesh
(Art. 7734)
 - 0,5 g wasserfreies Natriumsulfat

Die Säulen wurden in 15 ml Chloroform (Art. 2445) gepackt und nach 30-minütiger Äquilibrierungszeit mit 15 ml Probenextrakt und 30 ml n-Hexan beschickt.

- Elution :
- 30 ml Toluol (Art. 8325)
 - 40 ml Toluol/Aceton (Art. 14) 38+2
 - 30 ml Diethylether (Art. 921)
 - 40 ml Methanol/Chloroform 35+5

Die letzte Fraktion wurde mit dem Rotationsverdampfer eingengt, die Rückstände mit zweimal 2 ml Aceton in 5 ml Glasfläschchen überführt und unter dem Abzug abgedampft.

Modifiziertes Verfahren nach TRUCKSESS et al. (1983):

Als Säule dienten 20 ccm Einwegspritzen. Die Elution konnte mittels VAC-ELUT-System durchgeführt werden (vergl. 1.2.3.1.).

- Säulenfüllung :
- 4,0 g Hyflo Super Cel
 - 7,0 g Aktivkohle (Art. 2186)
 - 5,0 g Aluminium fein gepulvert (Art. 1056)
 - 3,0 g Hyflo-Super-Cel

- Elution :
- 40 ml Acetonitril/Wasser 84+16

Bei diesem Versuch wurden zur genauen Bestimmung der Elutionszeiten 200 ml Acetonitril/Wasser (84+16) in 50 ml Portionen über die Säule gegeben. In einem weiteren Versuch wurden dann 100 ml Acetonitril/Wasser in 20 ml Portionen über die Säule gegeben.

C-18-System (BOND ELUT):

Um eine bessere Aufreinigung besonderes verschmutzter Eluate zu erreichen, erfolgte die Aufreinigung der Proben noch mittels VAC-ELUT System über C-18 Kartuschen. Hierbei gelangten verschiedene Methanolkonzentrationen zur Elution:

Aktivierung der Säule : - 2 ml 100% Methanol
 - 5 ml dest. Wasser

Elutionsversuche : - 20% Methanol
 - 40% Methanol
 - 60% Methanol
 - 80% Methanol

Für die einzelnen Elutionen wurden jeweils 5 ml der angegebenen Methanolkonzentrationen benutzt.

2.2. Nachweis von Deoxynivalenol in artifiziell kontaminierten Futtermitteln

Aufgrund der Ergebnisse der in 2.1. beschriebenen Vorversuche wurden die zu untersuchenden Proben künftig nach dem modifizierten Verfahren nach TRUCKSESS et al. (1983) extrahiert und aufgereinigt. Für die anschließenden Versuche wurden die folgenden Futtermittel mit Deoxynivalenol artifiziell kontaminiert:

- Hafer
- Mais
- Gerste
- Weizen
- Mischfutter

2.2.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis

2.2.1.1. Fließmittel

In Anbetracht der unterschiedlichen Zusammensetzung des Probenmaterials wurden folgende Fließmittel getestet:

- Chloroform/Methanol 7:1
- Chloroform/Methanol 9:1
- Chloroform/Aceton/Isopropanol (Art. 9634) 8:1:1
- Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (Art. 246) 6:3:1
- Toluol/Aceton/Methanol 6:3:1

Für die Versuche wurden auf jede DC-Fertigplatte (Kieselgel 60) je 2 µg Standardtoxin und 1 g Probenaliquot von Hafer, Mais, Gerste, Weizen und Mischfutter aufgetropft. Nach einer Laufstrecke von 14 cm konnten die Platten aus den Kammern genommen, und unter dem Abzug getrocknet werden.

2.2.1.2. Derivatisierungsverfahren

Nach dem Entwickeln der DC-Platten wurden drei Derivatisierungsverfahren getestet. Hierbei wurde mit Standardtoxin (2 µg/Spot) und artifiziell kontaminiertem Probenmaterial gearbeitet.

- Besprühen der DC-Platte mit 20%iger Schwefelsäure (Art. 716) und anschließendes Erhitzen der Platte auf 120°C (20 min).
- Besprühen der DC-Platte mit Aluminiumchloridlösung und anschließendes Erhitzen der Platte auf 120°C (10 min) (TRUCKSESS et al., 1983).

Sprühflüssigkeit: - 15 g Aluminiumchlorid (Art. 801081)

- 85 ml Ethanol (Art. 983)

- 15 ml dest. Wasser

- Derivatisierung nach SANO et al. (1982).
 - Tauchen der DC-Platte in 4%ige Nicotinamidlösung (Art. 6818);
Lösungsmittel: Aceton/Ethanol 5:1,
 - Lufttrocknen der Platte; im Brutschrank für 15 min auf 160°C,

- Tauchen der DC-Platte in 3%ige Acetylpyridinlösung (EGA-Chemie Nr. A2-100-2) in n-Hexan; Lufttrocknen der Platte,
- Besprühen der Platte mit 2 n Kaliumhydroxid (Art. 5033); Lösungsmittel: Ethanol (80%); Lufttrocknen der Platte,
- Tauchen in Ameisensäure/Diethylether (3:7); Lufttrocknen der Platte
- Platte für 4 min bei 100°C im Brutschrank.

2.2.1.3. Bestimmung von Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate

Mais, Hafer, Weizen, Gerste und Mischfutter wurden mit 150 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 400 µg/kg, 500 µg/kg und 1000 µg/kg Deoxynivalenol artifiziell kontaminiert. Die Extraktion und Elution erfolgte nach dem Verfahren von TRUCKSESS et al. (1983). Die aufgereinigten Extrakte wurden auf DC-Fertigplatten 60 und HPTLC-Platten aufgetropft und nach Entwicklung in Chloroform/Methanol (7:1) mit Aluminiumchloridlösung derivatisiert (vergl. 2.2.1.2.).

Auswertung der Platten:

Die Auswertung der derivatisierten DC-Platten erfolgte unter einem UV-Betrachter bei einer Wellenlänge von 366 nm. Zur Identifizierung von Deoxynivalenol wurden Farbe bei Tageslicht (graubraun), Fluoreszenz (blau) und R_f-Werte herangezogen. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde bei den Spikeversuchen mit internem und externem Standard gearbeitet.

Sämtliche Proben wurden visuell und mit dem DC-Scanner ($\lambda = 366$ nm, Hg-Lampe) densitometrisch gemessen. Die Meßgeschwindigkeit der DC-Platten betrug 2 mm/s, die Meßspaltlänge 10 mm, die Meßspaltbreite 0,3 mm. Mittels eines an den Scanner angeschlossenen Potentiometer-schreibers (Papiervorschub 100 mm/min) konnten die Deoxynivalenol-Konzentrationen in graphischer Form als Peak dargestellt werden. Die Toxinmengenberechnung wurde durch den Vergleich von Peakflächen der Proben mit den Peakflächen des externen Standards durchgeführt. Vor den Versuchsreihen mußte die Linearität des Scanners mit DON bestimmt werden. Verschiedene Konzentrationen von Deoxynivalenol wurden nebeneinander auf eine DC-Platte aufgetragen und mit Aluminiumchlorid derivatisiert. Nach der fluordensitometrischen Auswertung konnte eine Kalibrierungskurve anhand der Peakflächen erstellt werden. Pro Probe wurden zwei Quantifizierungen durchgeführt aus denen ein Mittelwert errechnet wurde. Betrug die Meßdifferenz der beiden Quantifizierungen mehr als 30%, erfolgte eine dritte Messung.

Zweidimensionale DC:

Um bei stärker verunreinigten Futtermitteln (Mischfutter, Mais) die Interferenzen im Bereich des R_f-Wertes von Deoxynivalenol zu verringern, wurden diese Proben mittels zweidimensionaler DC analysiert. Als Laufmittel dienten hierbei :

- Chloroform/Methanol (7:1)
- Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (6:3:1)

2.2.2. Gaschromatographie - Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

2.2.2.1. Derivatisierungsmethoden

Zwei Methoden für die Derivatisierung von Deoxynivalenol (Standard und artifiziell kontaminierte Proben) wurden ausgetestet:

- MBTFA (20 µl) 12 h 60°C
- TRI-SIL (20 µl) 15 min 60°C, dann 200 µl dest Wasser zugeben und gut schütteln; 10 µl Chloroform zufügen und auf dem Rüttler 30 s mischen; Deoxynivalenol befindet sich in der unteren Phase.

2.2.2.2. GC-FID Bedingungen für den Nachweis von Deoxynivalenol

Das Gerät wurde in 1.2.3.3. genauer beschrieben. Für die Analytik von Deoxynivalenol aus Futtermitteln konnte mit folgenden Bedingungen gearbeitet werden:

Temperaturprogramm : 120°C (2 min)
120°C - 220°C (15°/min)
260°C - 280°C (10°/min)

Injektionstemperatur : 120°C; splitlose Injektion

Injektionsmenge : 1 µl

Detektortemperatur : 280°C

Trägergas : Helium 0,6 kg/cm²

Make up Gas : Stickstoff, Fluß: 30 ml/min

FID : Sauerstoff, Fluß: 300 ml/min
Wasserstoff, Fluß: 35 ml/min

Der qualitative Deoxynivalenol-Nachweis erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten der Probenpeaks mit denen von Standardtoxin, das unter gleichen Bedingungen chromatographiert wurde. Eine quantitative Berechnung der Toxinmengen in den Proben konnte durch den Vergleich der Peakhöhen mit denen, der unter gleichen Bedingungen injizierten externen Standards durchgeführt werden (GAREIS, 1982).

2.2.2.3. Überprüfung der Linearität des Detektors

Der lineare Bereich des Flammenionisationsdetektors wurde durch Injektionen von Standardtoxin folgender Mengen bestimmt: 20 ng; 90 ng; 130 ng; 160 ng und 200 ng. Die Derivatisierung erfolgte durch TRI-SIL/TBT (vergl. 2.2.2.1.). Nach der Auswertung konnte eine Kalibrierungskurve anhand der Counts erstellt werden. Pro Probe erfolgte eine zweimalige Injektion, bei der Quantifizierung wurde dann mit dem Mittelwert gearbeitet.

2.2.2.4. Bestimmung von Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate

Um die Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate des GC-FID zu bestimmen wurden Mais, Hafer, Weizen, Gerste und Mischfuttermittel mit unterschiedlichen Konzentrationen (50; 100; 150; 200; 250; 300; 500 µg/kg) Deoxynivalenol kontaminiert.

Die Proben wurden nach dem von TRUCKSESS et al. (1983) beschriebenen

Verfahren extrahiert und eluiert. Als weiterer Reinigungsschritt erfolgte eine Elution der Proben über C-18 (BOND ELUT) Säulen (vergl. 2.1.3.3.).

Die mittels TRI-SIL/TBT derivatisierten Extrakte gelangten zur Analyse.

2.3. Analytik und Nachweis von Deoxynivalenol in Feldproben

Zur Untersuchung kamen die in 1.1 beschriebenen 107 Proben. Von jedem Futter und Nahrungsmittel wurde ein Doppelansatz mit je 50 g angelegt. Sämtliche Proben wurden bis zur Analyse bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.3.1. Extraktion und Aufreinigung

Zur Verwendung kam das modifizierte Verfahren von TRUCKSESS et al. (1983). Die Proben wurden mit der Labormühle (MOULLINEX) bei 2000 U/min zerkleinert und in 500 ml Weithalserlenmeyerkolben überführt. Anschließend erfolgte mit 200 ml Acetonitril/Wasser (168+32) für 30 min auf dem Rüttler die Extraktion. Nach der Filtration (Filter: SCHLEICHER u. SCHÖLL Nr. 311652) wurde mit 20 ml Rohextrakt (= 5 g Probe) weitergearbeitet. Zur Entfettung des Rohextraktes mußte dieser zweimal mit je 50 ml n-Hexan im Scheidetrichter intensiv ausgeschüttelt werden. Die Hexanphasen wurden verworfen.

Säulenchromatographische Aufreinigung der Feldproben:

20 ml des entfetteten Rohextraktes wurden auf die Säule (Abb. 8) gegeben. Deoxynivalenol wurde mit 40 ml Acetonitril/Wasser (84+16) bei einem Unterdruck von 7 mm Hg eluiert, das Eluat in einen Rundkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer eingengt. In zweimal 2,5 ml Ethylacetat (60⁰C Wasserbad, Rüttler, Ultraschallbad) wurden die Rückstände gelöst und in 5 ml Abdampfpläschen überführt. Unter dem Abzug wurden die Proben erneut eingengt.

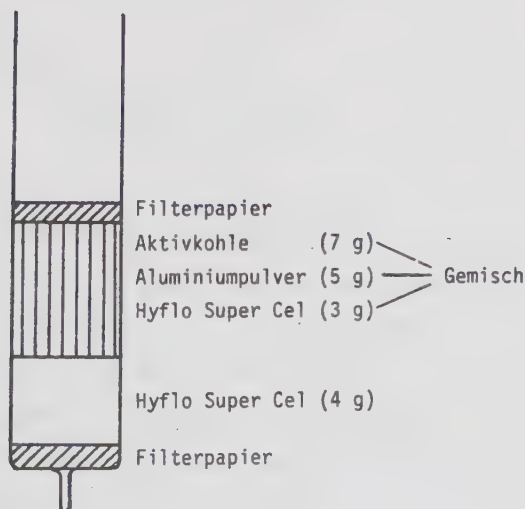


Abbildung 8 : Säule für die Aufreinigung von Deoxynivalenol-haltigen Proben

2.3.2. Analytische Dünnschichtchromatographie

5 g Probenaliquot des aufgereinigten Extraktes wurden in 100 µl Chloroform/Acetonitril (4+1) gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden auf Kieselgel 60 Platten aufgetragen und diese mit internem und externem Toxinstandard chromatographiert. Chloroform/Aceton/Iso-propanol (8:1:1) diente als Laufmittel. Nach dem Entwickeln wurden die Platten bei Raumtemperatur getrocknet und mit Aluminiumchlorid derivatisiert (vergl. 2.2.1.2.). Die Auswertung der DC-Platten erfolgte mittels UV-Betrachter (366 nm) und DC-Scanner.

2.3.3. Präparative Dünnschichtchromatographie

Sämtliche bei der DC-Analytik (vergl. 2.3.2.) positive Proben wurden mit dem Probenauftragegerät auf eine Kieselgel 60 Platte aufgetragen. Nach Entwicklung der Platten in 200 ml Chloroform/Methanol (9+1) wurde auf der Höhe des R_f-Wertes von Deoxynivalenol der Kieselbelag auf einer Breite von 1 cm entfernt. Das gewonnene Kieselgelpulver wurde mit 30 ml Aceton über 24 Stunden auf dem Schüttler extrahiert. Nach der Filtration erfolgte ein Einengen der Proben (Rotationsverdampfer) und eine anschließende Überführung der Eluate in Derivatisierungsgläschen. Bis zur Derivatisierung lagerten die Proben im Kühlschrank bei 4°C.

2.3.4. GC-FID und GC-MS

Der Nachweis von Deoxynivalenol in Feldproben mittels GC-FID erfolgte analog zu den in 2.2.2. beschriebenen Verfahren für Standardtoxin und die artifiziell kontaminierten Proben.

Bei der GC-MS wurde im Selected Ion Monitoring (SIM) Betrieb gearbeitet. Dabei konnten zwei für Deoxynivalenol-TMS charakteristische Ionen (m/e 497 (Basepeak) und m/e 513 ($M + H^+$)) erfaßt werden. Kriterien für eine positive Identifizierung waren der Nachweis dieser charakteristischen Ionen, deren relative Intensitäten und die Übereinstimmung der Retentionszeiten mit der des Standardtoxins.

Ein Überblick über die Gesamtanalyse von Deoxynivalenol aus Feldproben ist in Abbildung 9 gegeben.

50 g gemahlene Probe

50 g gemahlene Probe

Extraktion mit 200 ml
Acetonitril/Wasser (168+32)
30 min schütteln
filtrieren

20 ml Filtrat

zweimal mit je 50 ml
n-Hexan im Scheidetrichter
ausschütteln; Hexanphase
verwerfen

Säulenchromatographie

40 ml Acetonitril/Wasser (84+16)
Eluat einengen und mit zweimal
2,5 ml Ethylacetat aufnehmen,
abdampfen; in 100 µl Chloroform/
Acetonitril(4+1) lösen
20 µl auf DC-Platte tropfen

Dünnschichtchromatographie

Laufmittel : Chloroform 88
Aceton 11
Isopropanol 1

Derivatisierung mit Aluminiumchlorid
Auswertung: UV-Betrachter, DC-Scanner

präparative DC

Laufmittel : Chloroform 9
Methanol 1

Extraktion mit 30 ml Aceton
Derivatisierung für GC mit TRI-SIL/TBT

GC-MS GC-FID

Abbildung 9 : Extraktions- und Reinigungsschema von Feldproben
für die dünnschicht- und gaschromatographische
Analyse (TRUCKSESS et al., 1983), modifiziert

3. Ergebnisse und deren Besprechung

3.1. Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung des artifiziell kontaminierten Probenmaterials

Mit allen unter 2.1.1. aufgeführten Lösungsmitteln konnte Deoxynivalenol zufriedenstellend aus den Futtermitteln extrahiert werden.

Aufgrund der in Tabelle 14 zusammengestellten Ergebnisse kristallisiert sich ein Acetonitril/Wasser-Gemisch als Extraktionsmittel der Wahl heraus.

Tabelle 14 : Überprüfung verschiedener Lösungsmittel für die Extraktion von Deoxynivalenol aus Maisgrieß

Extraktionsmittel (200 ml)	Menge (in ml)	Wiederfindungsrate (in %)
Acetonitril	168	90 - 95
Wasser	32	
Acetonitril	200	90
Methanol	100	75
Wasser	100	

Von denen in 2.1.2. beschriebenen Aufreinigungsmöglichkeiten der Rohextrakte erwiesen sich die Methoden nach ROMER et al. (1978) und TRUCKSESS et al. (1983) als gleich effizient. Bei beiden Methoden wurde eine weitgehende Befreiung der Rohextrakte von Futtermittel-

farbstoffen und Fetten bzw. Proteinen erreicht. Nach dem Ausschüteln mit n-Hexan (TRUCKSESS et al., 1983) wurde dieses auf eventuelle Rückstände von Deoxynivalenol untersucht; DON konnte hier nicht gefunden werden.

Bei der in 2.1.3. beschriebenen Aufreinigungsmethode nach ROMER et al. (1978) wurde das Toxin in der Methanol/Chloroform-Fraktion gefunden. In allen anderen Fraktionen konnte kein Deoxynivalenol nachgewiesen werden.

Wegen des geringen Aufwands an Zeit und Material bei annähernd gleichen Resultaten wurden die Rohextrakte der Feldproben nach der Methode von TRUCKSESS et al. (1983) aufgereinigt.

Von den ausgetesteten säulenchromatographischen Aufreinigungsmöglichkeiten (vergl. 2.1.3.) erwies sich das modifizierte Verfahren nach TRUCKSESS et al. (1983) als besonders geeignet. Der Vorteil dieser Methode liegt im Zeitfaktor: Für eine Probenaufreinigung werden wegen des verwendeten VAC-ELUT-Systems nur durchschnittlich 20 min benötigt. Auch können mit Hilfe dieses Gerätes bis zu neun Proben parallel aufgereinigt werden.

Bei den modifizierten Säulen konnte durch die in 2.1.3. beschriebenen Versuche gezeigt werden, daß Deoxynivalenol nach einer Elution von 40 ml Acetonitril/Wasser (84+16) zum größten Teil wiedergefunden wird. Die prozentuale Verteilung der Deoxynivalenol-Konzentration in Abhängigkeit von der Elutionsflüssigkeitsmenge ist in Abbildung 10 wiedergegeben.

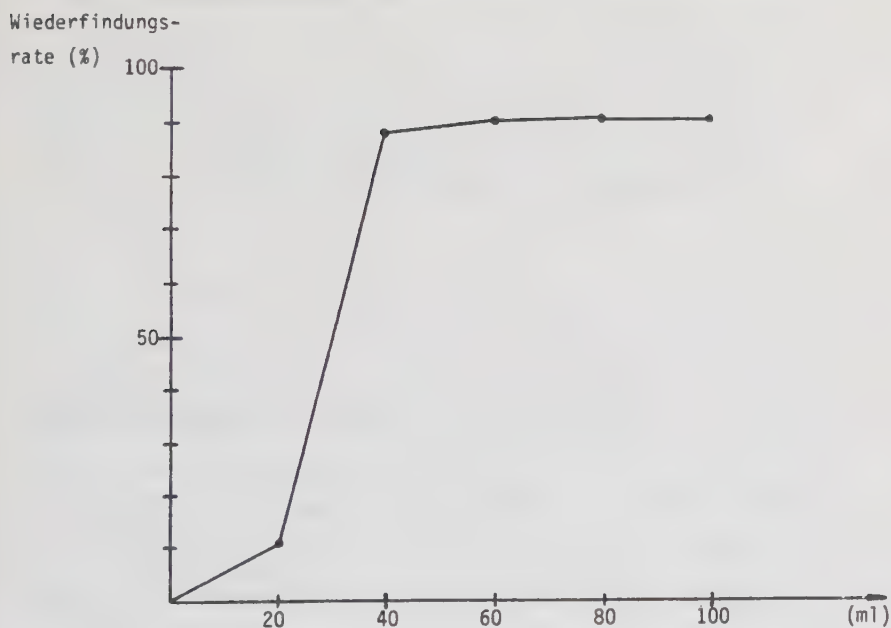


Abbildung 10 : Prozentuale Wiederfindungsrate von Deoxynivalenol bei säulenchromatographischer Aufreinigung in Abhängigkeit des Elutionsvolumens

Bei der weiteren Aufreinigung des Probenmaterials über C-18 (BOND-ELUT) erwies sich eine Konzentration von 80%igem Methanol als am sinnvollsten. Zuvor sollte die Säule jedoch mit 60%igem Methanol gespült werden, um eine möglichst optimale Reinigung der Extrakte zu erzielen. In Tabelle 15 sind die unterschiedlichen Reinigungseffekte von 20%igem bis 80%igem Methanol dargestellt.

Tabelle 15 : Ergebnisse der Aufreinigung von Probenmaterial über C-18 Säulen bei verschiedenen Methanolkonzentrationen

Methanol (5 ml) (%)	Wiederfindungsrate (%)	DC-Bild im Bereich des Rf-Wertes von Deoxynivalenol
20	0	leicht verunreinigt
40	0	stark verunreinigt
60	0	sehr stark verunreinigt
80	85	leicht verunreinigt

3.2. Ergebnisse zum Nachweis von Deoxynivalenol in artifiziell kontaminiertem Probenmaterial

Wie aus Tabelle 16 ersichtlich ist, verteilen sich die Störsubstanzen der einzelnen Futtermittel unterschiedlich über die DC-Platte. Das bei allen Futtermitteln in Bezug auf Verunreinigungen im Rf-Wertbereich von Deoxynivalenol geeignetste Laufmittel ist Chloroform/Acton/Isopropanol (8:1:1). Besonders bei stark farbintensiven Futtermittelextrakten wie etwa Mais oder Mischfutter, sind die Vorteile dieses Laufmittels besonders klar hervorgetreten.

Die zweidimensionale DC brachte im Vergleich zum Mehraufwand an Zeit und Material nur geringfügige Vorteile. Die Versuche zeigten, daß zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Deoxynivalenol eine eindimensionale Chromatographie für sämtliche getesteten Probenmaterialien genügend war.

Tabelle 16 : Ergebnisse der DC-Analytik bei Futtermitteln in
Abhängigkeit von unterschiedlichen Laufmitteln

Laufmittel	Verteilung	Rf-Wert	Störsubstanzen im Bereich des Rf-Wertes von Deoxynivalenol				
			Hafer	Mais	Gerste	Weizen	Mischfutter
Chloroform	7	0,46	++	+++	+	Ø	+++
Methanol	1						
Chloroform	9	0,65	+	++	++	++	++
Methanol	1						
Chloroform	8	0,41	+	++	+	Ø	+
Aceton	1						
Isopropanol	1						
Toluol	6	0,23	Ø	+++	++	+	++
Ethylacetat	3						
Ameisensäure	1						
Toluol	6	0,33	+	++	++	++	++
Aceton	3						
Methanol	1						

Ø : keine Störsubstanzen

+

++ : mittelgradige Störsubstanzen

+++ : hochgradige Störsubstanzen

Vergleich der Derivatisierungsmethoden:

Bei den in 2.2.1.2. beschriebenen Derivatisierungsmethoden erwies sich die Besprühung der DC-Platten mit Aluminiumchlorid und anschließender Erhitzung am geeignetsten. Der Vorteil dieser Methode liegt in der sehr klar erkennbaren Fluoreszenz von Deoxynivalenol nach der Derivatisierung, hervorzuheben sind auch der geringe Chemikalien- und Zeitaufwand bei dieser Behandlung der DC-Platten.

Beim Besprühen der Kieselgelplatten mit Schwefelsäure war der graublaue Spot nicht so klar zu erkennen wie der dunkelblaue Spot bei der Aluminiumchlorid-Derivatisation. Insbesondere im Bereich niedriger Toxinkonzentrationen konnten hier Fehlinterpretationen auftreten; eine Verwechslung mit interferierenden Substanzen ist möglich.

Die Methode von SANO et al. (1982) zeigte sich als äußerst zeit-, arbeits- und chemikalienaufwendig. Die Ergebnisse waren mit denen der Schwefelsäurebehandlung vergleichbar. In Tabelle 17 werden die drei Methoden vergleichend dargestellt.

Tabelle 17 : Ergebnisse der unterschiedlichen Derivatisation von Deoxynivalenol auf DC-Platten

verwendete Chemikalien	Farbe nach Derivatisierung	Zeitaufwand/ Platte (min)
Aluminiumchlorid	dunkelblau (UV 366 nm)	15
Schwefelsäure	grau blau (Tageslicht)	25
Nicotinamid Acetylpyridin Kaliumhydroxid Ameisensäure Diethylether	hellblau (UV 366 nm)	65

Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten:

Wie in 2.2.1.3. beschrieben, wurden Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten von Deoxynivalenol durch artifiziell kontaminierte Proben mit unterschiedlicher Toxinkonzentration durchgeführt. Nach dem Auftragen von 1 g Probenaliquot zeigte die HPTLC-Platte bei der Nachweisgrenze etwas bessere Werte als die Kieselgel 60 Platte. Bei Mais, Hafer, Weizen und Gerste konnte eine Nachweisgrenze von 300 µg/kg ermittelt werden, bei Mischfutter betrug die Nachweisgrenze 500 µg/kg. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammen gestellt.

Tabelle 18: Ergebnisse zur Wiederfindungsrate (%) und Nachweisgrenze (µg/kg) in artifiziell kontaminierten Futtermitteln bei der DC-Analytik

Futtermittel	Konzentrationen von Deoxynivalenol				
	250 µg/kg	300 µg/kg	400 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Mais	Ø	65	75	85	90
Gerste	Ø	70	75	80	85
Weizen	Ø	70	75	85	85
Hafer	Ø	65	65	70	80
Mischfutter	Ø	Ø	20	60	70

Die Auswertung der DC-Platten erfolgte unter dem UV-Betrachter (366 nm). Die Bestimmung der Wiederfindungsraten konnte durch Vergleich mit unterschiedlichen Standardtoxinkonzentrationen durchgeführt werden. Diese semiquantitativen Messungen sind mit dem DC-Scanner überprüft worden. Wie Abbildung 11 zeigt, liegen die gefundenen Deoxynivalenol-Konzentrationen im linearen Bereich des Scanners.

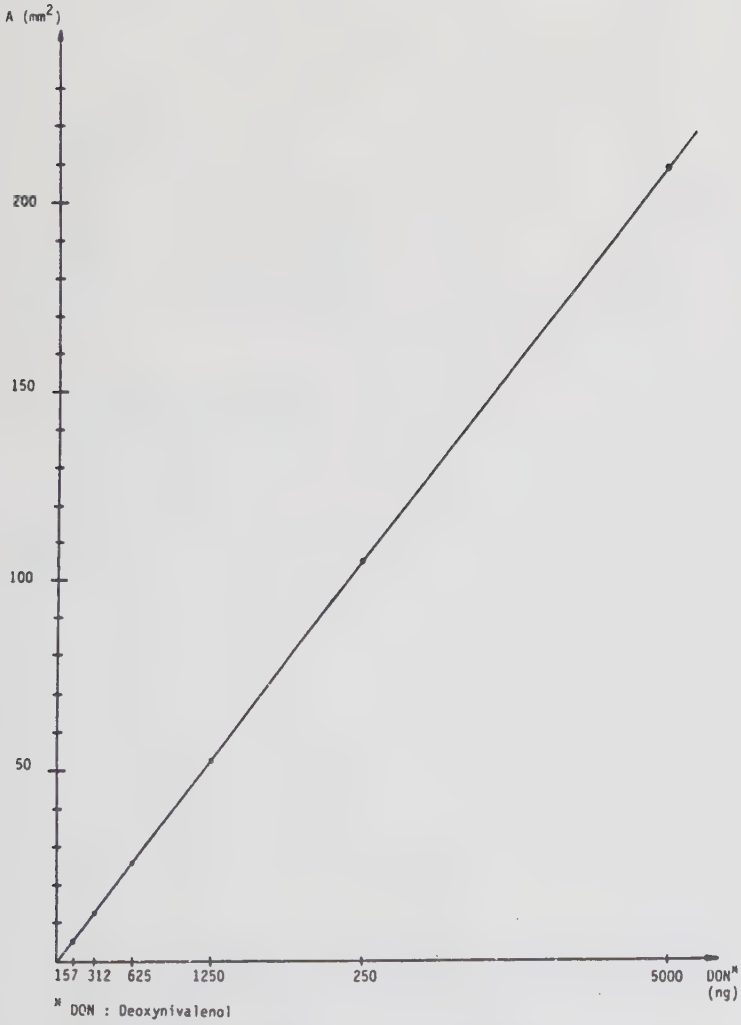


Abbildung 11: Kalibrierungskurve des DC-Scanners für Deoxynivalenol

Ergebnisse der GC-FID Untersuchungen:

Die in 2.2.2.1. beschriebenen Versuche zur Derivatisierung von Deoxynivalenol vor der GC-Analytik zeigten, daß DON mit TRI-SIL/TBT vollständig derivatisiert werden kann, während die Derivatisierung mittels MBTFA zu unterschiedlichen Derivaten führte.

Auch die kurze Reaktionszeit von 15 Minuten ist labortechnisch günstiger als die 12 Stunden dauernde Derivatisierung mit MBTFA.

Die Ergebnisse der Überprüfung des Linearitätsbereiches des FID sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Wie hieraus ersichtlich ist, liegen die getesteten Toxinkonzentrationen (20 - 220 ng) innerhalb des linearen Bereiches des Detektors.

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Versuche zur Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate von Deoxynivalenol mittels GC-FID dargestellt (vergl. 2.2.2.4.).

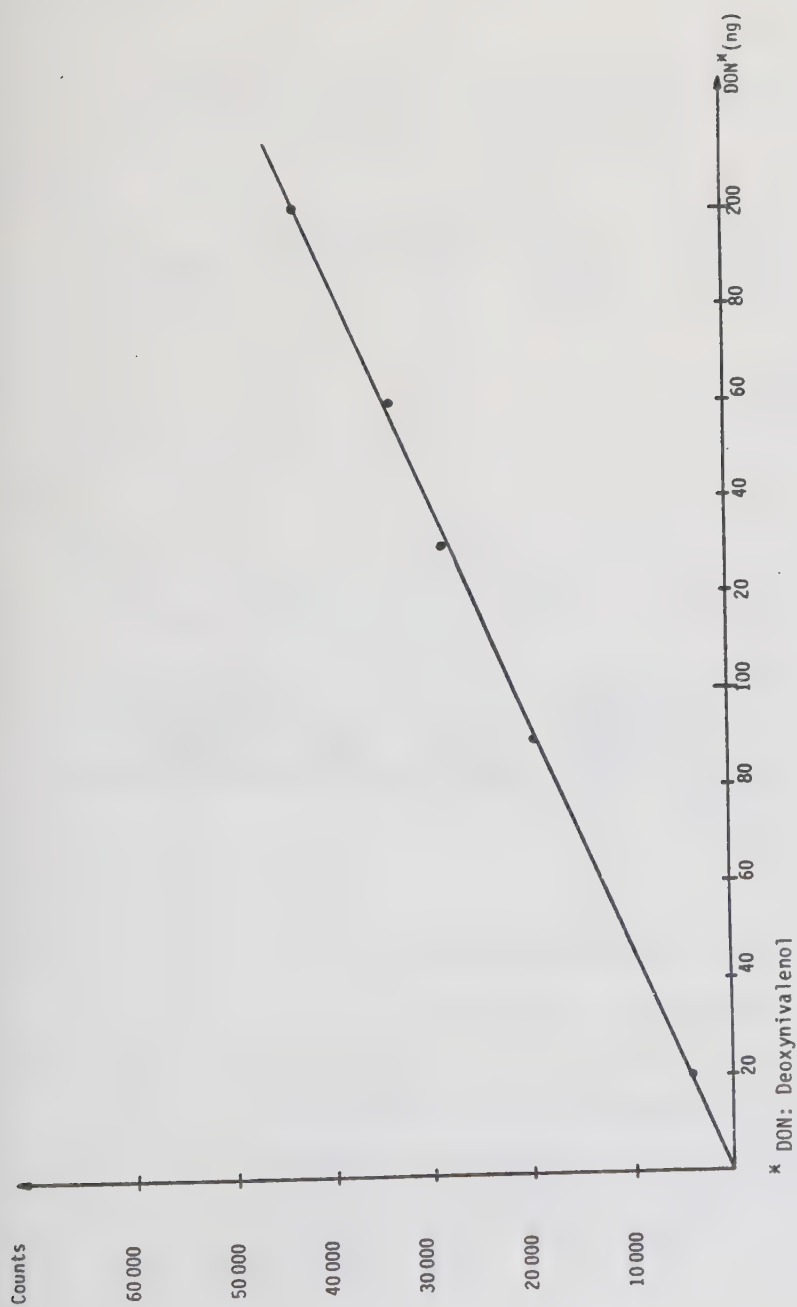


Abbildung 12 : Standardkurve von Deoxynivalenol zur Bestimmung der Linearität des FID

Tabelle 19 : Ergebnisse zur Wiederfindungsrate (%) und Nachweisgrenze ($\mu\text{g/kg}$) in artifiziell kontaminierten Futtermitteln bei der GC-FID Analytik

Futtermittel	Deoxynivalenol-Konzentrationen			
	200 $\mu\text{g/kg}$	250 $\mu\text{g/kg}$	300 $\mu\text{g/kg}$	500 $\mu\text{g/kg}$
Mais	Ø	70	85	85
Gerste	20	75	85	90
Weizen	Ø	75	80	85
Hafer	20	75	85	85
Mischfutter	Ø	40	70	80

3.3. Ergebnisse zur Analytik von Deoxynivalenol in Feldproben

Die in 1.1. aufgeführten Feldproben wurden nach dem modifizierten Verfahren von TRUCKSESS und Mitarbeitern (1983) aufbereitet und analysiert (vergl. 2.3.). Folgende Ergebnisse konnten bei den Untersuchungen erzielt werden.

3.3.1. Resultate der DC-Untersuchungen

Von den 107 untersuchten Proben wurde in 13 Proben (= 12,5%) Deoxynivalenol mittels DC-Analytik nachgewiesen. In Abbildung 13 ist die Verteilung der positiven Futtermitteln innerhalb der einzelnen Proben graphisch dargestellt. Bei den Maisproben waren sechs der untersuchten Feldproben, bei Hafer vier, bei Weizen zwei und bei Gerste eine Probe positiv. Bei den Mischfuttermitteln und

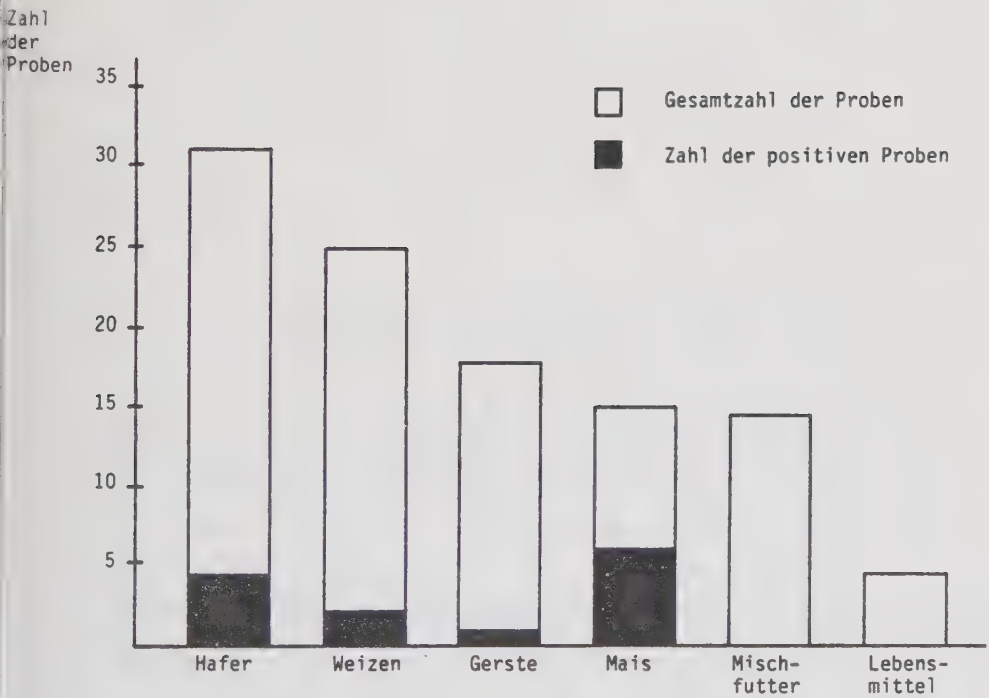


Abbildung 13 : Verteilung der positiven Feldproben nach DC-Analyse

Nahrungsmitteln konnte Deoxynivalenol nicht nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Deoxynivalenol-Konzentration in den Proben betrug 0,6 mg/kg. Die Maisproben waren mit durchschnittlich 1,2 mg/kg am stärksten belastet, die Gerstenproben mit 0,3 mg/kg am schwächsten.

3.3.2. Resultate der GC-FID und GC-MS Untersuchungen

Die 13 bei der DC-Analytik als positiv beurteilten Proben wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie (vergl. 2.3.4.) weiter aufgereinigt. Diese Proben wurden nach Derivatisierung sowohl mittels GC-FID als auch GC-MS analysiert.

Trotz der weiteren Aufreinigung über präparative DC, zeigten die GC-FID Chromatogramme noch starke Verunreinigungen. In Abbildung 14 sind diese beispielhaft bei den Maisproben (Nr. 12/86 und 8/86) zu erkennen. Der Deoxynivalenol-Peak ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Identifizierung von Deoxynivalenol erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten von Probe und Standardtoxin (Abb. 14 c) (vergl. 2.3.5.).

Eine eindeutige Identifizierung von Deoxynivalenol war erst mittels GC-MS möglich. In Abbildung 16 sind der Totalionenstrom und die Massenchromatogramme von DON-Standard dargestellt. Abbildung 15 zeigt die erstellten GC-MS Chromatogramme einer Maisprobe (Nr. 12/86) (zugehöriges GC-FID Chromatogramm: Abb. 14 b). Ein qualitativ

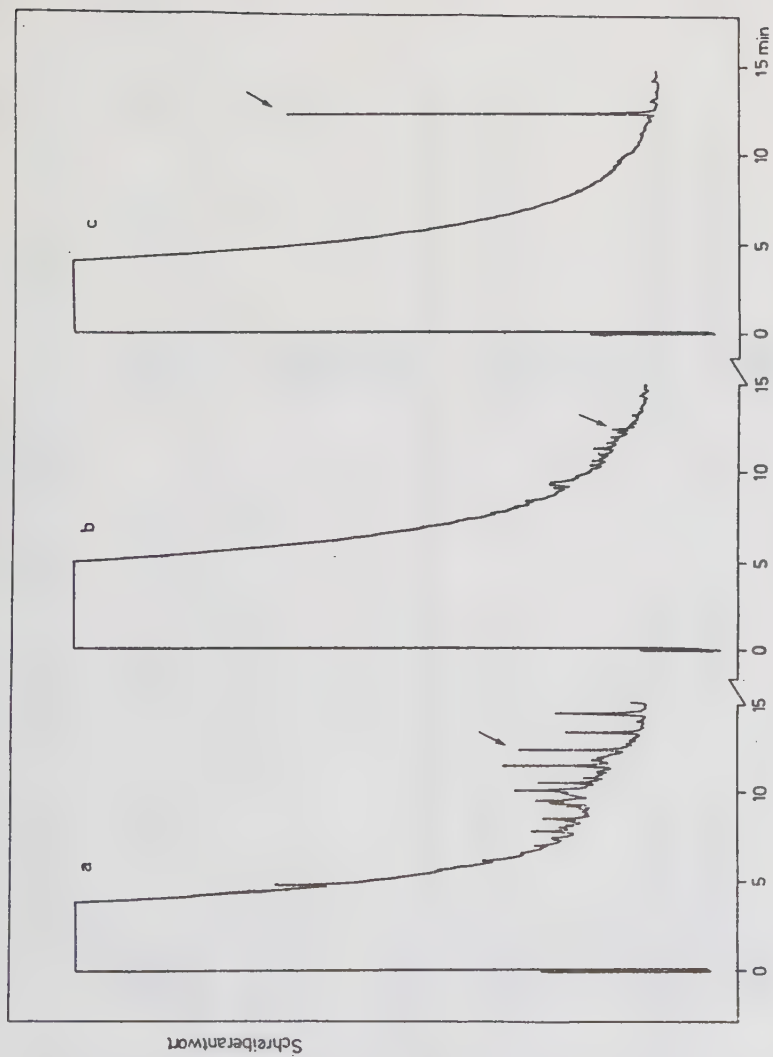


Abbildung 14 : FID Chromatogramme der Maisprobe 8/86 (a), Maisprobe 2/86 (b) und Standardtoxin (c)
nach Derivatisierung mit Tri-Sil/TBT

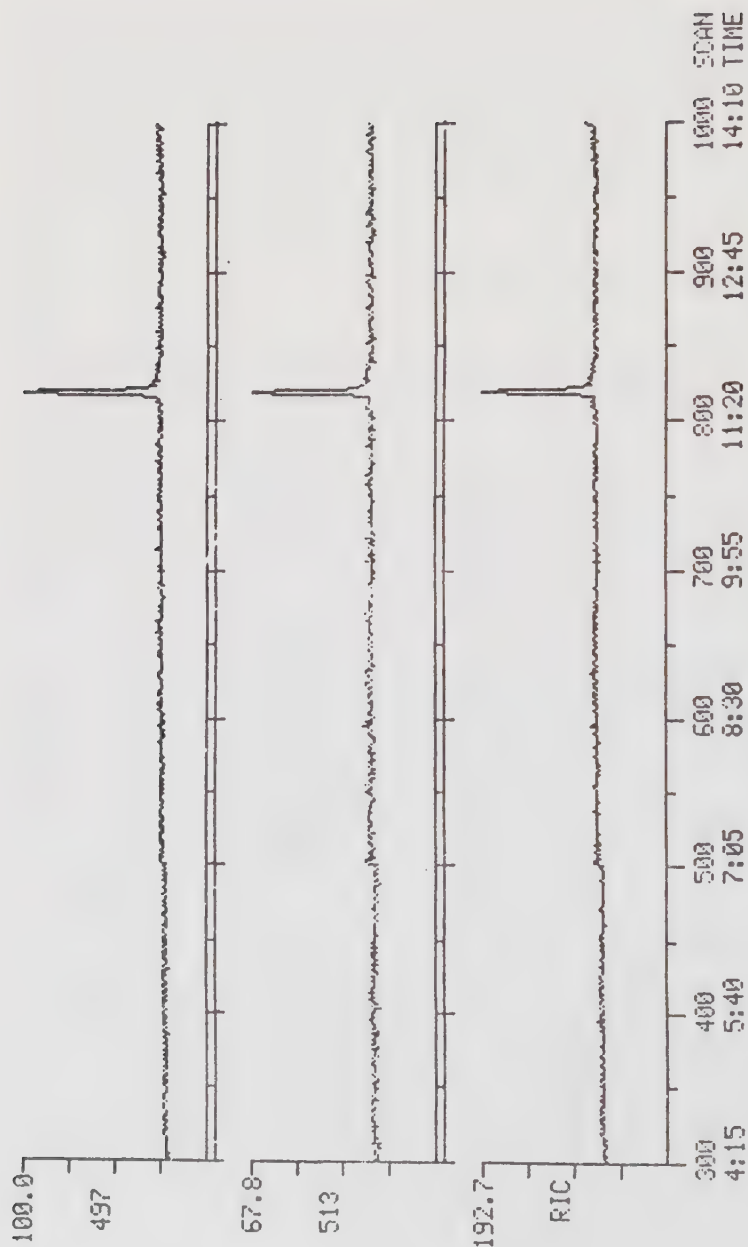


Abbildung 15 : Rekonstruiertes Ionenchromatogramm (RIC) und Massenchromatogramme der DON-positiven Maisprobe 12/86 bei chemischer Ionisation in Methan

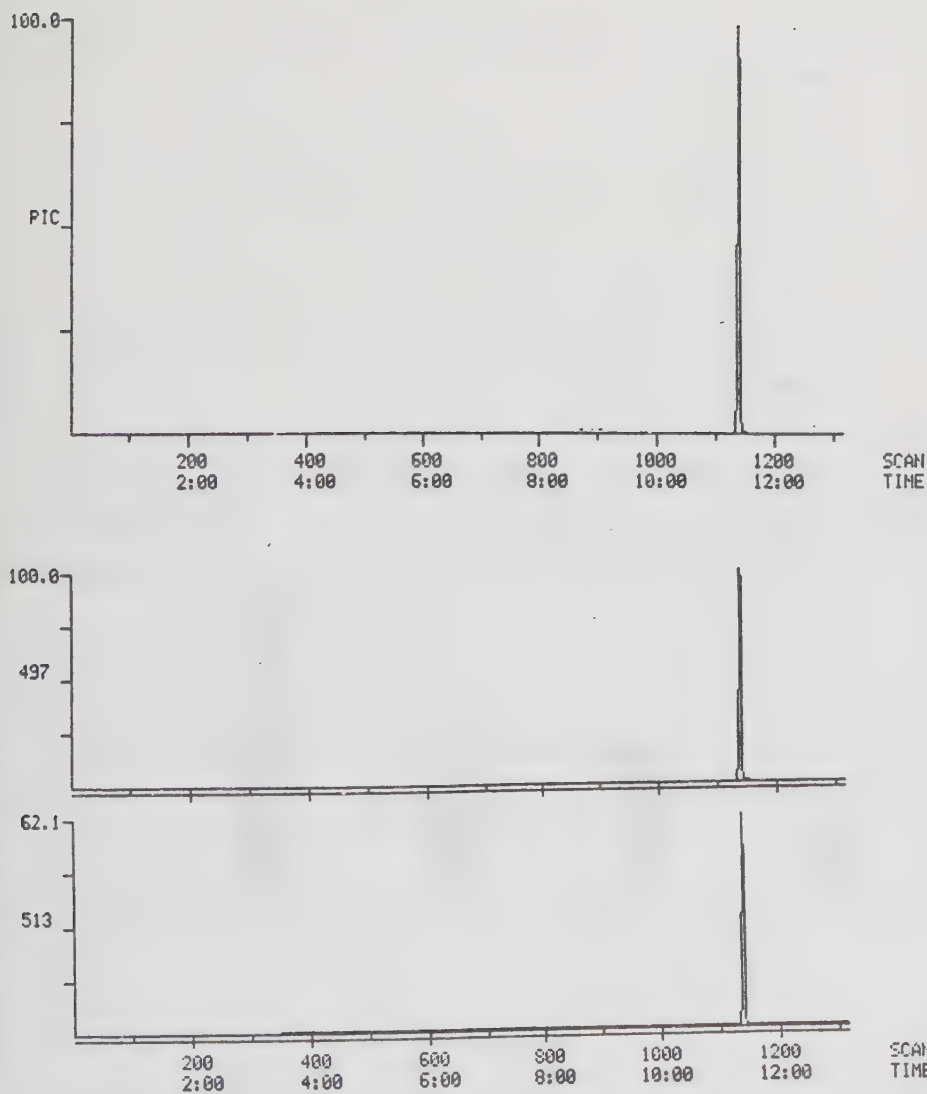


Abbildung 16 : Rekonstruiertes Ionenchromatogramm (RIC) und Massen-
chromatogramme (m/e 497 und 513) von DON nach Tri-
Sil/TBT-Derivatisation

sicherer Nachweis für das Vorhandensein von Deoxynivalenol war somit gewährleistet.

Insgesamt konnten bei drei Proben (Mais 8/86, Mais 9/86, Hafer 28/86) die positiven GC-FID Befunde mittels GC-MS nicht bestätigt werden.

Das Begleitsubstanzen aus der Probenmatrix mit Deoxynivalenol bei der GC-FID interferieren können wird in den Chromatogrammen der Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14 a zeigt das Chromatogramm einer Maisprobe (Nr. 8/86) in dem eine Störsubstanz gleiche Retentionszeit wie Deoxynivalenol-Standardtoxin (Abb. 14 c) aufweist. Bei der GC-MS Analyse konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich bei diesem Peak nicht um Deoxynivalenol handelte.

Von den 13 nach DC als kontaminiert beurteilten Proben, konnte bei neun Proben durch GC-MS das DC Ergebnis bestätigt werden. Die Verteilung der positiven Proben nach GC-MS ist in Abbildung 17 graphisch wiedergegeben.

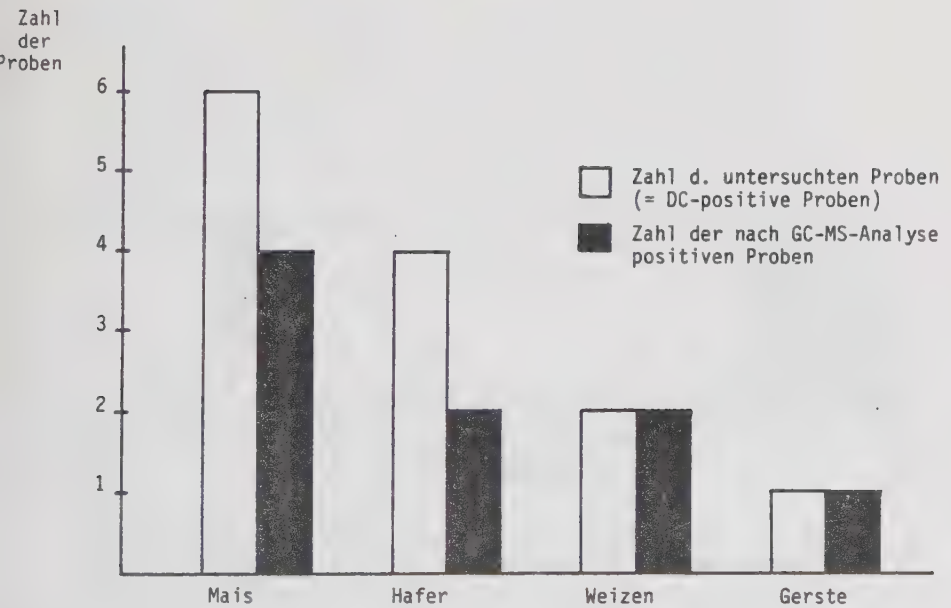


Abbildung 17 : Verteilung der positiven Proben nach GC-MS-Analyse

3.3.3. Zusammenfassende Gegenüberstellung der Ergebnisse

Wie aus 3.2.2. hervorgeht, ist ein eindeutiger Nachweis von DON nur durch GC-MS Analyse möglich. In Tabelle 20 werden die durchschnittlichen Konzentrationen von Deoxynivalenol bei den einzelnen Futtermitteln angegeben.

Während nach der DC-Untersuchung noch 12,5% der Proben als DON-haltig beurteilt wurden, waren nach der GC-MS Analyse nur noch 8,4% der Proben positiv. In Abbildung 18 ist eine Verteilung der Deoxynivalenol-haltigen Cerealien (Hafer, Weizen, Mais, Gerste) dargestellt. Mischfutter- und Lebensmittel sind nicht berücksichtigt. Die höchsten Anteile der Deoxynivalenol-kontaminierten Proben wurden beim Mais und Hafer gefunden.

Tabelle 20 : Deoxynivalenol-Konzentrationen in den verschiedenen Cerealien des Feldversuches bei unterschiedlichen Nachweismethoden

Futtermittel	Anzahl Pr./ pos. Proben	Durchschnittl. DON-Gehalt (mg/kg)		
		DC	(Bereich) GC-FID	GC-MS
Hafer	30/2	0,5 (0,4;0,6)	0,5 (0,4;0,6)	0,6 (0,47;0,73)
Mais	15/4	1,2 (0,9-1,6)	1,4 (1,0-1,7)	1,6 (1,1-1,8)
Gerste	18/1	0,3	0,3	0,3
Weizen	25/2	0,8 (0,6;1,0)	0,9 (0,7;1,1)	1,1 (0,95;1,25)

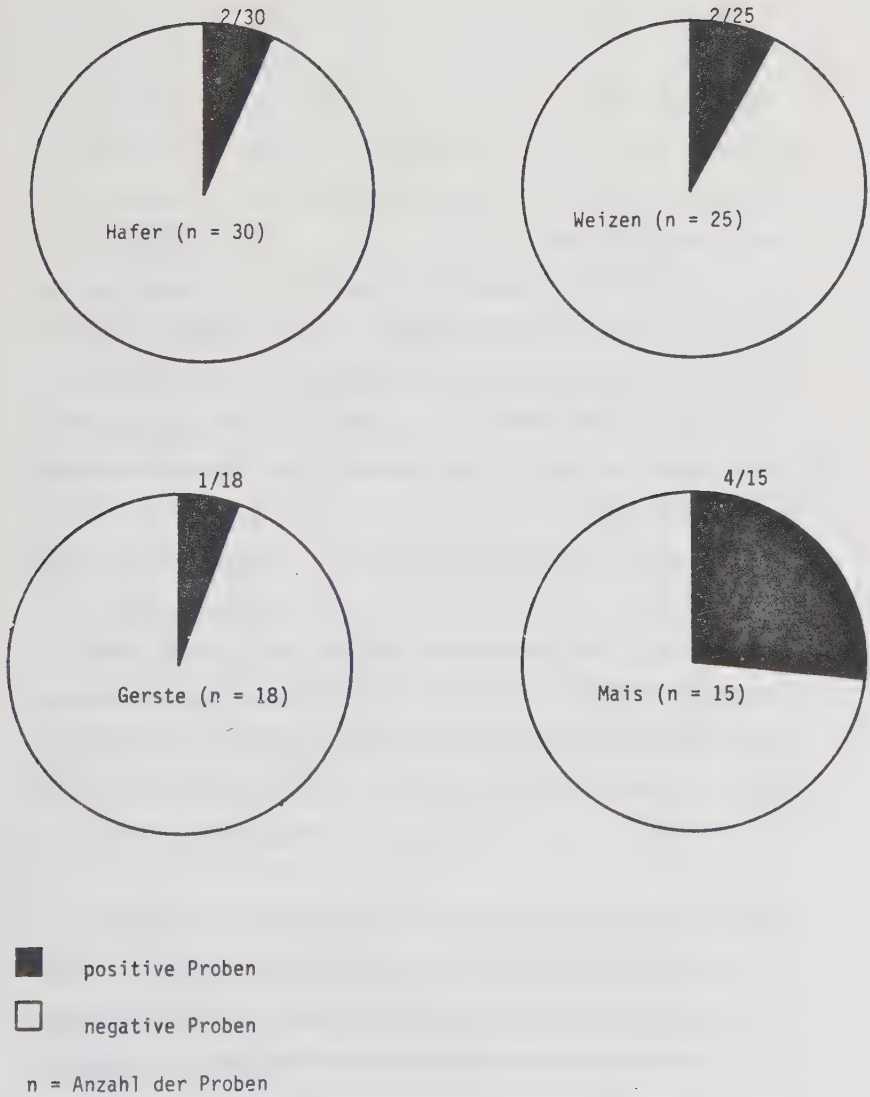


Abbildung 18 : Verteilung der Deoxynivalenol-haltigen Proben bei verschiedenen Cerealien

D) Diskussion

Der Anspruch, der an ein Analysenverfahren gestellt werden kann, beinhaltet vor allem die sichere Identifizierung der nachzuweisenden Substanz und daneben einen möglichst geringen Aufwand an Analysenmaterial und Zeit.

Im Laufe der letzten Jahre sind für den Nachweis von Deoxynivalenol in Futter- und Lebensmittel eine Reihe, zum Teil unterschiedlichste, Verfahren beschrieben worden (vergl. Tab. 9 - 12). Dabei zeigten insbesondere die Untersuchungen von TANAKA und Mitarbeiter (1985), daß der Wahl geeigneter Extraktionsmittel große Bedeutung zukommt. Innerhalb der eigenen Untersuchungen konnte mit Acetonitril/Wasser (168+32) bei der Extraktion von artifiziell kontaminiertem Probenmaterials bessere Wiederfindungsraten (90%) ermittelt werden, als mit Acetonitril oder einem Methanol/Wasser-Gemisch, die in verschiedenen Publikationen (SCOTT et al., 1981; BLAAS et al., 1984) als Extraktionsmittel beschrieben werden. Zu vergleichbaren Resultaten gelangten TANAKA et al. (1985), die mit einem Acetonitril/Wasser-Verhältnis von 3:1 höchste Wiederfindungsraten erzielten.

Für die chromatographische Reinigung des Rohextraktes erwies sich das von TRUCKSESS und Mitarbeitern (1983) beschriebene Trennmaterial aus Aluminiumpulver, Aktivkohle und Hyflo Super Cel in Verbindung mit dem bei Unterdruck arbeitenden VAC-ELUT-System als besonders geeignet. Hier können innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne von ca. 20 Minuten bis zu neun Rohextrakte parallel aufgereinigt werden.

Dabei werden pro Probe lediglich 40 ml Elutionsmittel benötigt, was hinsichtlich der Lösungsmittlexposition und des Kostenfaktors ein weiterer Vorteil im Vergleich zu anderen Methoden (ROMER et al., 1978; EPPLEY et al., 1984) ist.

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung in Chloroform/Methanol/Isopropanol des derartig vorbereiteten Probenmaterials konnten Störsubstanzen weitgehend abgetrennt werden, wobei in Abhängigkeit von der Probenmatrix Wiederfindungsraten von 70% (Mischfuttermittel) bis 90% (Mais) und Nachweisgrenzen von 300 µg/kg (Cerealien) bis 500 µg/kg (Mischfuttermittel) bestimmt werden konnten. Die Derivatisierung der DC-Platte mit Aluminiumchlorid erwies sich als günstig.

Nach Derivatisation mit TRI-SIL/TBT konnten die Extrakte sowohl mit GC-FID als auch GC-MS analysiert werden. Nachdem die Derivatisation mit MBTFA nicht vollständig war, und die Reaktion mit HFBI (SCOTT et al., 1981) zu einem DON-Derivat mit sehr hoher Massenzahl ($m/e > 800$) führt, die mit dem zur Verfügung stehenden GC-MS nicht mehr erfaßt werden kann, erwies sich die durchgeführte Methode mit TRI-SIL/TBT als praktikabel.

Nach der DC-Analytik waren 13 der 107 untersuchten Proben positiv. Diese Proben wurden mittels präparativer DC weiter aufgereinigt und mit dem GC-FID und GC-MS überprüft. Bei der GC-FID Analyse wurde das Toxin teilweise durch interferierende Störsubstanzen (Futterfarbstoffe) überlagert. Solche Störsubstanzen bei der GC-FID Analy-

tik werden von mehreren Autoren beschrieben (VISCONTI und PALMISANO, 1982; GAREIS et al., 1985). Wie auch von GAREIS et al. (1985) empfohlen, wurde auch bei diesem Feldversuch die entgültige Identifizierung von Deoxynivalenol mittels GC-MS durchgeführt.

Da, wie sich zeigte, die DC-Analyse nicht immer den eindeutigen Nachweis von Deoxynivalenol zuläßt, sollten alle DC-positiven Befunde erneut überprüft werden. Hierzu eignet sich in erster Linie die massenspektrometrische Untersuchung, bei der auch Störsubstanzen mit gleichem chromatographischem Verhalten wie DON sicher abgegrenzt werden können. Diese Untersuchungstechnik ist jedoch aus Kostengründen oder mangels geeigneter Analysengeräte nicht immer möglich. Um Interferenzsubstanzen aus der Probenmatrix zu entfernen wird häufig mit zweidimensionaler DC gearbeitet (STAHR et al., 1979). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen reichte für den Deoxynivalenol-Nachweis eine eindimensionale DC aus (vergl. 3.2.). Eine weitere Aufreinigung vor der GC-Analyse könnte durch einen HPLC-Schritt erreicht werden. Als Nachteil dieser Methode ist jedoch ein nicht vermeidbarer Substanzverlust anzusehen.

THALMANN et al. (1985) untersuchten in den Jahren 1979/80 und 1982 Futtermittel des deutschen Marktes auf Deoxynivalenol. Von 101 Proben der Ernte 1979 waren 4% der Futtermittel kontaminiert, von den 292 Proben der Ernte 1982 waren 11% der Proben Deoxynivalenol-haltig. Die Konzentrationen schwankten zwischen 0,01mg/kg und 2,0 mg/kg. Für den Anstieg der Deoxynivalenol-positiven Funde wurden wit-

terungsbedingte Ursachen angeführt. Unter den Cerealien stellten Mais mit 19% und Hafer mit 15% den höchsten Anteil der positiven Proben. Auch LEIBETSEDER (1982) stellte bei seinen Untersuchungen fest, daß in Mitteleuropa Mais hauptsächlich mit Deoxynivalenol kontaminiert ist. Wie aus Abbildung 19 zu entnehmen ist, stehen diese Befunde in Einklang mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen.

Nach GC-MS Analytik waren 8,4% aller untersuchten Futtermittel und Lebensmittel Deoxynivalenol-haltig. Dieser Wert entspricht in etwa einem Durchschnittswert bei anderen in Mitteleuropa auf DON durchgeführten mykotoxikologischen Untersuchungen (GRUBER und THALMANN, 1981; THALMANN et al., 1985).

Anders hingegen ist die Situation in Nordamerika zu beurteilen. Hier sind die Anteile der Deoxynivalenol-haltigen Proben am Untersuchungsmaterial deutlich höher als in Europa (vergl. Tab. 4). Die Weizenproben nehmen hier eine Schlüsselstellung ein (TRENHOLM et al., 1983; EPPLEY et al., 1984).

Die wenigen positiven Resultate bei Mischfutteruntersuchungen (MIROCHA et al., 1976; THALMANN et al., 1985) befinden sich wiederum in weitgehender Übereinstimmung der vorliegenden Ergebnisse eigener Untersuchungen.

Durch das Verschneiden der verschiedenen Futtermittelkomponenten bei der Mischfutterherstellung wird der Deoxynivalenol-Gehalt im Endprodukt stark gesenkt.

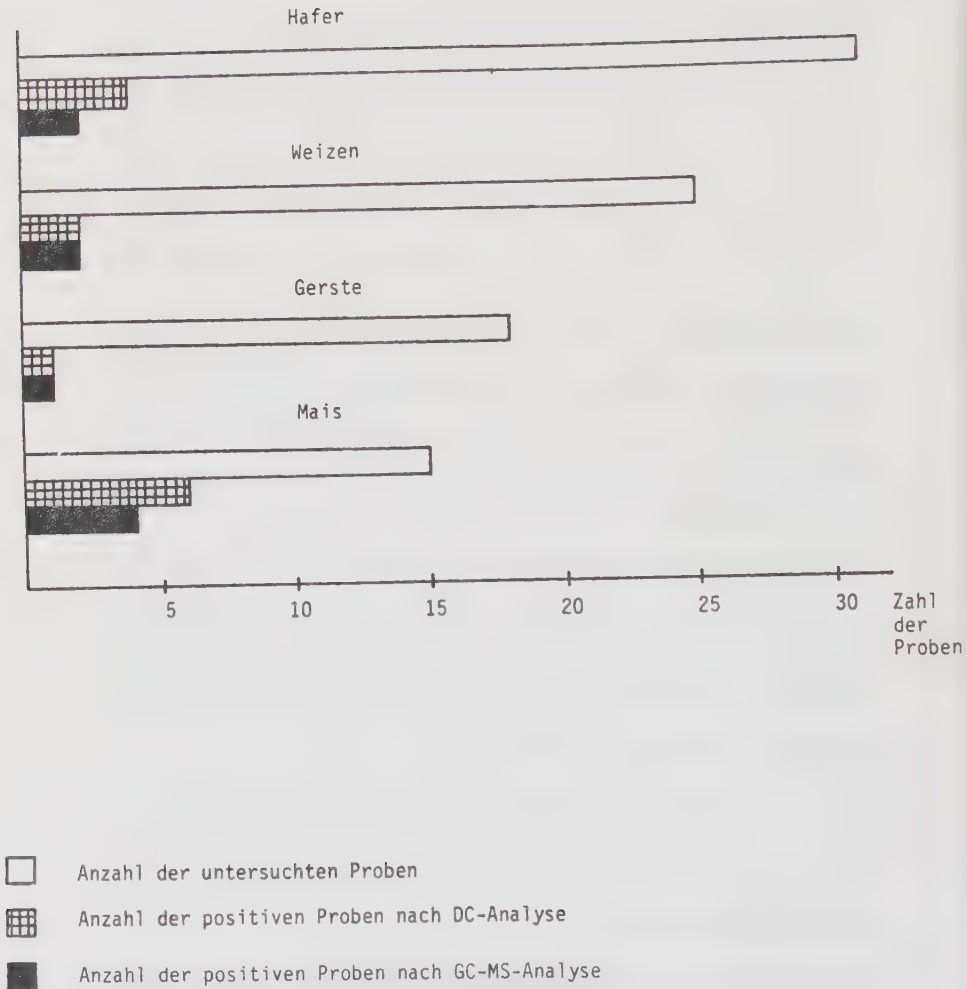


Abbildung 19 : Verteilung der Deoxynivalenol-haltigen Proben bei den einzelnen Cerealien nach DC- und GC-MS-Analyse

In Mitteleuropa schwanken die Konzentrationen von Deoxynivalenol im Probenmaterial zwischen 0,01 mg/kg und 2,0 mg/kg (THALMANN et al., 1985). Höchste Werte konnten im Mais (bis zu 2,0 mg/kg) und Weizen (bis zu 1,3 mg/kg) detektiert werden. HALAMA (1982) untersuchte in Österreich Maissilagen. Die Deoxynivalenol-Konzentrationen lagen hier zwischen 0,2 mg/kg und 0,6 mg/kg. Die in Tabelle 20 aufgeführten Konzentrationen der hier aufgeführten Studie liegen im Bereich der in Mitteleuropa auch von anderen Autoren publizierten Werte (GURBER und THALMANN, 1981; THALMANN et al., 1985). Auch hierbei waren Mais und Weizen stärker kontaminiert (1,6 mg/kg bzw. 1,1 mg/kg) als Gerste (0,4 mg/kg) und Hafer (0,6 mg/kg). Höhere Konzentrationen, wie etwa von BAUER und GEDEK (1980) bei einer Haferprobe beschrieben, hier wurden pro kg Hafer 20 mg Deoxynivalenol nachgewiesen, treten in Europa nur bei Verdachtsproben auf. Das Probenmaterial war in diesem Fall vorselektiert, diese Resultate werden nicht bei Routine- und Reihenuntersuchungen erzielt. Probenmaterial mit derartigen hohen Toxinkonzentrationen gelangt in der Regel nicht routinemäßig, sondern meist erst nach Erkrankung von Nutztieren zur mykotoxikologischen Analyse.

E) Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Analytik von Deoxynivalenol (DON, Vomitoxin) in Nahrungsmitteln und dem Vorkommen dieses Mykotoxins in natürlich kontaminierten Probenmaterial.

Dazu wurden Versuche zur Extraktion und Aufreinigung des Toxins aus artifiziell und natürlich kontaminierten Probenmaterial durchgeführt. Der Nachweis von Deoxynivalenol erfolgte durch dünnschichtchromatographische Methoden (DC), Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).

Die verschiedenen Nachweismethoden wurden auf ihre Leistungsfähigkeit geprüft und diesbezüglich miteinander verglichen.

Zur Analyse erwies sich eine Methode als geeignet, die es ermöglicht bei geringem Zeit- und Materialaufwand einen hohen Probendurchlauf zu erreichen. Mittels diesem modifizierten Verfahren nach TRUCKSESS et al. (1983) wurden Feldproben (Mais, Gerste, Hafer, Weizen, Mischfutter, Lebensmittel) untersucht.

Folgende Resultate wurden erzielt:

- Durch die Extraktion von Deoxynivalenol aus Probenmaterial mittels Acetonitril/Wasser (168+32) konnten Wiederfindungsraten von über 90% erzielt werden. Zum Entfetten der Rohextrakte erwies sich ein Ausschütteln mit Hexan als sinnvoll.

- Die säulenchromatographische Trennung der Extrakte an Aluminiumpulver, Aktivkohle und Hyflo Super Cel im VAC-ELUT-System ermöglicht ein paralleles Bearbeiten von bis zu neun Proben innerhalb von ca. 20 Minuten.
- Beim DC-Nachweis erwies sich ein Fließmittelgemisch aus Chloroform/Aceton/Isopropanol (8:1:1) als besonders geeignet, Verunreinigungen im Bereich des Rf-Wertes von Deoxynivalenol abzutrennen. Derivatisiert wird DON durch Besprühen der DC-Platte mit Aluminiumchlorid. Die Nachweisgrenzen liegen bei artifizell kontaminiertem Hafer, Mais, Gerste und Weizen im Bereich von 300 µg/kg; bei Mischfutter im Bereich von 500 µg/kg.
- Nach GC-Trennung der mit TRI-SIL/TBT derivatisierten Extrakte erfolgte der Toxinnachweis sowohl mit FID als auch mit MS. Beim Selected Ion Monitoring (SIM) der charakteristischen Massen für DON-TMS (m/e 497 und 513) konnte das Toxin eindeutig identifiziert werden.
- Bei der Untersuchung von 107 Feldproben (Cerealien, Lebensmitteln) zeigte sich, daß sowohl DC- als auch GC-FID Analyse wegen mit Deoxynivalenol-interferierender Substanzen zu falsch positiven Befunden führten. So erwiesen sich nach der DC-Untersuchung 12,5% der Proben als kontaminiert, während nach GC-MS nur noch bei 8,4% der Proben Deoxynivalenol detektiert werden konnte.
- Die durchschnittlichen Konzentrationen von Deoxynivalenol lagen nach GC-MS Analytik zwischen 0,4 mg/kg (Gerste), 0,6 mg/kg (Hafer), 1,1 mg/kg (Weizen) und 1,6 mg/kg (Mais). Mais (vier

positive Proben/15 untersuchte Proben) und Weizen (zwei positive Proben/25 untersuchte Proben) waren häufiger belastet als Hafer (zwei positive Proben/30 untersuchte Proben) und Gerste (eine positive Probe/18 untersuchte Proben). In Mischfutter und Lebensmitteln wurde kein Deoxynivalenol nachgewiesen.

Summary

Analysis and occurrence of the mycotoxin deoxynivalenol

This paper describes the analysis of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in animal feed and foodstuffs.

For that purpose experiments have been made to extract and clean up this toxin from artificially and naturally contaminated samples. The detection was done by thin layer chromatography (TLC), gas-liquid chromatography-flame ionization detection (GC-FID) and gas-liquid chromatography-massspectrometry (GC-MS).

The different methods of analysis were tested for their effectiveness and compared.

A method proved to be suitable for analysis, which permitted a large number of samples to be analyzed with a minimum expenditure of time and material. This modified method, described by TRUCKSESS et al. (1983), was used to examine field samples (oats, barley, wheat, corn, mixed feed and foodstuffs).

The following results were obtained:

- Extraction of DON from samples by means of acetonitrile/water (168+32) permitted a recovery rate of more than 90%. Clean of the extracts with hexane proved to be suitable to remove lipids.

- Column chromatography (charcoal, aluminum, celite) in the VAC-ELUT-System allows cleaning up of up to nine samples in about 20 minutes.
- Working with TLC, the plates should be developed in a mixture of chloroform/acetone/isopropanol (8:1:1), which was found to be especially suitable to clean up the interferences in the region of the R_f-value of DON. For derivatisation the plates are sprayed with AlCl₃. The detection limits for artificially contaminated cereals are 300 µg/kg, for mixed feeds 500 µg/kg.
- The extracts had been derivatized by TRI-SIL/TBT for the GC-analysis. The detection of Deoxynivalenol was done with FID and MS. Working with Selected-Ion-Monitoring (SIM), DON-TMS (m/e 497 and 513) was clearly identified.
- The examination of 107 naturally contaminated samples showed, that because of substances interfering with DON, both TLC and GC-FID analysis produced false positive results. Thus after TLC analysis 12,5% of the samples turned out to be contaminated, after GC-MS analysis only 8,4% of the samples were positive.
- After GC-MS analysis the average concentrations of Deoxynivalenol were between 0,4 mg/kg (barley), 0,6 mg/kg (oats), 1,1 mg/kg (wheat) and 1,6 mg/kg (corn). Corn (four positive samples/15 examined samples) and wheat (two positive samples/25 examined samples) were contaminated more frequently than oats (two positive samples/30 examined samples) and barley (one positive sample/18 examined samples). In mixed feed and foodstuffs DON was not detected.

F) Literaturverzeichnis

- ABBAS, H. K., MIROCHA, C. J., TUITE, J., 1986:
Natural occurrence of deoxynivalenol, 15 acetyl-
deoxynivalenol and zearalenone in refusal factor
corn stored since 1972.
Appl. Envir. Microbiol., 51, 841-843.
- ABRAMSON, D., MILLS, J. T., BOYCOTT, B. R., 1983:
Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in
Western Canada.
Can. J. Comp. Med., 47, 23-26.
- BAUER, J., 1980:
Zur Leistungsfähigkeit mykotoxikologischer
Untersuchungsmethoden.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 93, 354-358.
- BAUER, J., GEDEK, B., 1980:
Fusarientoxine als Ursache von Futterverweigerung
und Fruchtbarkeitstörungen beim Pferd.
Tierärztl. Umsch., 35, 600-603.
- BATA, A., VANYI, A., LASZTITY, R., 1983:
Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas
- liquid chromatography.
J. Assoc. Off. Anal., Chem., 66, 577-581.
- BENNETT, G. A., PETERSON, R. E., PLATTNER, R. O., SHOTWELL,
O. L., 1981:
Isolation and purification of deoxynivalenol and a
new trichothecene by high pressure liquid chromatography.
IAOCS, December, 1002A-1005A.

- BENNETT, G. A., STUBBLEFIELD, R. D., SHANNON, G. M.,
SHOTWELL, O. L., 1983:
Gas chromatographic determination of deoxynivalenol
in wheat.
J. Assoc. Off. Anal., Chem., 66, 1478-1480.
- BLAAS, W., KELLERT, M., STEINMEYER, S., TIEBACH, R., WEBER,
R., 1984:
Untersuchung von Cerealien auf Deoxynivalenol und
Nivalenol im unteren $\mu\text{g/kg}$ -Bereich.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 179, 104-108.
- BLACKWELL, B. A., MILLER, J. R., GREENHALGH, R., 1985:
¹³C NMR study of biosynthesis of toxins by *Fusarium*
graminearum.
J. Biol. Chem., 260, 4243-4247.
- BOOTH, C., 1971:
The Genus *Fusarium*.
Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey,
England.
- BULLERMANN, L. B., 1979:
Significance of mycotoxins to food safety and human
health.
J. Food Prot., 42, 65-86.
- BURMEISTER, H. R., VESONDER, R. F., KWOLEK, W. F., 1980:
Mouse bioassay for *Fusarium* metabolites: rejection
or acceptance when dissolved in drinking water.
Appl. Envir. Microbiol., 39, 957-961.

- CHANG, H. L., DeVRIES, J. W., LARSON, P. A., PATEL, H. H.,
1984:
Rapid determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by
liquid chromatography using modified Romer column
cleanup.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 52-54.
- CHAVEZ, E. R., 1984:
Vomitoxin-contaminated wheat in pig diets: pregnant
and lactating gilts and weaners.
Can. J. Anim. Sci., 64, 717-723.
- COHEN, H., LAPOINTE, M., 1982:
Capillary gas-liquid chromatographic determination
of vomitoxin in cereal grains.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65, 1429-1434.
- COLE, R. J., COX, R. H., 1981:
Handbook of toxic fungal metabolites.
Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney,
San Francisco, 152-264.
- COPPOCK, R. W., SWANSON, S. P., GELBERG, H. B., KORITZ, G.
D., HOFFMAN, W. E., BUCK, W. B., VESONDER, R. F.,
1985:
Preliminary study of the pharmacokinetics and toxic-
opathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine.
Am. J. Vet. Res., 46, 165-168.
- COTE, L. M., NICOLETTI, J., SWANSON, S. P., BUCK, W. B.,
1986:
Production of deepoxydeoxynivalenol (DOM-1), a meta-
bolite of deoxynivalenol, by in vitro rumen incubation.
J. Agric. Food Chem., 34, 458-460.

- COTE, L. M., REYNOLDS, J. D., VESONDER, R. F., BUCK, W. B., SWANSON, S. P., COFFEY, R. T., BROWN, D. C., 1984:
Survey of vomitoxin-contaminated feed grains in mid-western United States, and associated health problems in swine.
J. A. Vet. Med. Ass., 184, 189-192.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980:
Compendium of soil fungi.
Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- EHRLICH, K. C., LEE, L. S., 1984:
Mycotoxins in grain dust: method for analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, vomitoxin and secalonic-acid D.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 963-967.
- EL-BANNA, A. A., 1983:
Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to eggs and meat in chickens feed deoxynivalenol-contaminated diets.
J. Agric. Food Chem., 31, 1381-1384.
- ENGELHARDT, G., SCHUSTER, M., LEPSCHY, J., WALLNÖFER, P. R., 1986:
Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in Germany.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 182, 123-126.
- ENDERS, C., 1984:
Zur Analytik von Zearalenon, α - und β -Zearalenol in Material pflanzlichen und tierischen Ursprungs.
Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilian-Universität München.

EPPLEY, R. M., 1974:

Sensitivity of brine shrimp (*Artemia salina*) to trichothecenes.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, 618-620.

EPPLEY, R. M., 1979:

Trichothecenes and their analysis.

J. Am. Oil Chem. Soc., 56, 824-829.

EPPLEY, R. M., TRUCKSESS, M. W., NESHEIM, S., THORPE, C. E., WOOD, G. E., POHLAND, A. E., 1984:

Deoxynivalenol in winter wheat: thin layer chromatographic method and survey.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 43-45.

FORSYTH, D. M., DeUIRARTE, L. A., TUIITE, J., 1976:

Improvement for swine of *Gibberella zeae* - damaged corn by washing.

J. Anim. Sci., 42, 1202-1206.

FRIEND, D. W., TRENHOLM, H. L., FISER, P. S., THOMPSON, B. K., HARTIN, K. E., 1983:

Effect on dam performance and fetal development of deoxynivalenol (vomitoxin) contaminated wheat in the diet of pregnant gilts.

Can. J. Anim. Sci., 63, 689-698.

FRIEND, D. W., TRENHOLM, H. L., YOUNG, J. C., THOMPSON, B. K., HARTIN, K. E., 1984:

Effect of adding potential vomitoxin (deoxynivalenol) detoxicants or a *F. graminearum* in occluded corn supplement to wheat diets fed to pigs.

Can. J. Anim. Sci., 64, 733-741.

GAREIS, M., 1982:

Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis
und zur Bildung von Trichothecen.

Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilian- Universität
München.

GAREIS, M., BAUER, J., GEDEK, B., 1985:

Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vor-
kommen von Trichothecen

Tierärztl. Praxis 1985, Supplement 1, 1-14.

GEDEK, B., 1972:

Biologischer Nachweis von Mykotoxinen.

Zentbl. Vet. Med. B., 19, 15-32.

GEDEK, B., 1980:

Kompodium der medizinischen Mykologie.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

GEDEK, B., BAUER, J., 1983:

Trichothecene problems in the Federal Republic of
Germany. In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical,
biological and toxicological aspects. Developments
in food Science 4.

Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 301-
307.

GREENHALGH, R., GILBERT, J., KING, R. R., BLACKWELL, B. A.,

STARTIN, J. R., SHEPHERD, M. J., 1984:

Synthesis, characterization, and occurrence in bread
and cereal products of an isomer of 4-deoxynivalenol
(vomitoxin).

J. Agric. Food Chem., 32, 1416-1420.

GREENHALGH, R., NEISH, G. A., MILLER, J. D., 1983:

Deoxynivalenol, acetyl-deoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates.

Appl. Envir. Microbiol., 46, 625-629.

GRUBER, S., THALMANN, A., 1981:

Untersuchungen über das Vorkommen von Mykotoxinen (außer Aflatoxin) in Futtermitteln und mögliche Zusammenhänge mit futterbedingten Leistungsminierungen und Erkrankungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Forschungsbericht 78 H S 12, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

HAGLER, W. M., TYCZKOWSKA, K., HAMILTON, P. B., 1984:

Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone, and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the Midwestern United States.

Appl. Envir. Microbiol., 47, 151-154.

HALAMA, A. K., 1982:

Mykotoxikosen bei Nutztieren und ihre Bekämpfung.

Wien. tierärztl. Mschr., 69, 308-314.

HALD, B., KROGH, P., 1983:

Toxicoses and natural occurrence in Denmark.

In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects. Developments in food science 4.

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 251-253.

- HART, L. P., BRASELTON, Jr., W. E., 1983:
Distribution of vomitoxin in dry milled fractions of
wheat infected with *Gibberella zeae*.
J. Agric. Food Chem., 657-659.
- HUFF, W. E., DOERR, J. A., HAMILTON, P. B., 1981:
Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in
broiler chickens.
Poult. Sci., 60, 1412-1414.
- ICHINOE, M., KURUTA, H., SUGIURA, Y., UENO, Y., 1983:
Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special
references to production of trichothecenes and
zearalenone.
Appl. Envir. Microbiol., 46, 1364-1369.
- IKEDIOBI, C. O., HSU, I. C., BAMBURG, J. R., STRONG, F. M.,
1971:
Gas-liquid chromatography of mycotoxins of the
trichothecene group.
Analyt. Biochem., 43, 327-340.
- JEMMALI, M., UENO, Y., ISHII, K., FRAYSSINET, C., ETIENNE,
M., 1978:
Natural occurrence of trichothecenes (nivalenol,
deoxynivalenol, T-2) and zearalenone in corn.
Separatum Experientia, 34, 1333.
- KAISER, R. E., 1979:
Optimierung in der HPLC.
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Basel, New
York.

- KAMIMURA, H., NISHIJIMA, M., YASUDA, K., SAITO, K., IBE, A., NAGAYAMA, T., USHIYAMA, H., NAOI, Y., 1981:
Simultaneous detection of several *Fusarium* myco-
toxins in cereals, grains and foodstuffs.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 1067-1073.
- KHERA, K. S., WHALEN, C., ANGERS, G., VESONDER, R. F.,
KUIPER-GOODMAN, T., 1982:
Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in
mice.
Bull. Envir. Contam. Toxicol., 29, 487-491.
- KIENTZ, C. E., VERWEIJ, A., 1986:
Trimethylsilylation on trifluoroacetylation of a
number of trichothecenes followed by gas chromato-
graphic analysis on fused-silica capillary columns.
J. Chromatogr., 355, 229-240.
- KING, R. R., GREENHALGH, R., BLACKWELL, B. A., 1984:
Oxidative transformation of deoxynivalenol (vomi-
toxin) for quantitative and chemical confirmatory
purposes.
J. Agric. Food Chem., 32, 72-75.
- KOMMEDAHL, T., WINDELS, C. E., 1977:
Fusarium stalk rot and common smut in cornfields of
southern Minnesota in 1976.
Plant Disease Reporter, 61, 259-261.
- LAFARGE-FRAYSSINET, C., LESPINATS, G., LAFONT, P.,
LOISILLIER, F., MOUSSET, S., ROSENSTEIN, Y.,
FRAYSSINET, C., 1979:
Immunosuppressive effects of *Fusarium* extracts and
trichothecenes: blastogenic response of murine
splenic and thymic cells to mitogens (40439).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 160, 302-311.

LEIBETSEDER, J., 1982:

Mykotoxinprobleme in der Schweineproduktion.
Kraftfutter, 11, 428-432.

LEW, H., WÜLLNER, E., HAGER, R., GREGOR, M., 1979:

Fütterungsprobleme bei Mastschweinen verursacht
durch fusarientoxinhaltigen Mais.
Die Bodenkultur, 30 309-316.

LUN, A. K., YOUNG, L. G., MORAN, E. T., HUNTER, D. B.,

RODRIGUEZ, J. P., 1986:

Effects of feeding hens a high level of vomitoxin-
contaminated corn on performance and tissue
residues.
Poult. Sci., 65, 1095-1099.

MAJERUS, P., WOLLER, R., 1984:

Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssig-
keitschromatographie in der Mykotoxinanalytik.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 178, 79-80.

MALALASEKERA, R. A. P., SANDERSON, F. R., COLHOUN, J., 1973:

Fusarium diseases of cereals: IX. Penetration and
invasion of wheat seedlings by fusarium culmorum and
Fusarium nivale.
Trans. Brit. mycol. Soc., 60, 453-462.

MARASAS, W. F. O., KRIEK, N. P. J., VAN RENSBURG, S. J.,

STEYN, M., VAN SCHALKWYK, G. C., 1977:

Occurrence of zearalenone and deoxynivalenol, myco-
toxins produced by Fusarium graminearum SCHWABE, in
maize Southern Africa.
S. Afr. J. Sci., 73, 346-349.

- McLAUGHLIN, C. S., VAUGHAN, M. H., CAMPBELL, I. M., WEI, C. M., STAFFORD, M. E., HANSEN, B. S., 1977:
Inhibition of protein synthesis by trichothecenes.
In: RODRICKS, J. W., HESSELTINE, C. W., MEHLMAN M. A.,
Mycotoxins in human and animal health.
Pathotox. Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, 263-273.
- MEYER, V., 1980:
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie,
Laborbücher der Chemie.
Frankfurt a. M. - Berlin - München: Verlage
Diesterweg/Salle, Aaran - Frankfurt a. M. -
Salzburg: Sauerländer Verlag.
- MILLER, J. D., TAYER, A., GREENHALGH, R., 1983:
Production of deoxynivalenol and related compounds
in liquid culture of *Fusarium graminearum*.
Can. J. Microbiol., 29, 1171-1178.
- MIROCHA, C. J., 1979:
Trichothecene toxins produced by *Fusarium*. In:
SHIMODA, W., Conference on mycotoxins in animal
feeds and grains related to animal health.
National technical information service, Springfield,
288-373.
- MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V., SCHAUERHAMMER, B.,
CHRISTENSEN, C. M., 1976:
Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff.
Appl. Envir. Microbiol., 32, 553-556.

MIROCHA, C. J., PAWLOSKY, R. A., CHATTERJEE, K., WATSON, S.,
HAYES, W., 1983:

Analysis for Fusarium toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asia.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66, 1485-1499.

MOROOKA, N., URATSUJI, N., YOSHIKAWA, T., YAMAMOTO, H.,
1972:

Studies on the toxic substances in barley infected with Fusarium spp.

Jap. J. Food Hyg., 13, 368-375.

MORRISSEY, R. E., 1984:

Teratological study of fischer rats fed diet containing added Vomitoxin.

Fd. Chem. Toxic., 22, 453-457.

NEERGARD, P., 1977:

Seed pathology.

Mac Millan Press Ltd; London, Basingstove.

NEISH, G. A., FARNWORTH, E. R., GREENHALGH, R., YOUNG, J.
C., 1983:

Observations on the occurrence of Fusarium species and their toxins in corn in eastern Ontario.

Can. J. Pl. Path., 5, 11-16.

NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., MARASAS, W. F. O., 1983:

Fusarium Species.

University Park, Penns. State Univ. Press.

PATHRE, S. V., MIROCHA, C. J., 1977:

Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence. In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W., MEHLMAN, M. A., Myktoxins in human and animal health. Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 229-253.

PLATTNER, R. D., BENNETT, G. A., 1983:

Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadrupole mass spectrometry/mass spectrometry.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66, 1476-1477.

POLLMANN, D. S., KOCH, B. A. SEITZ, L. M., MOHR, H. E.,
KENNEDY, G. A., 1985:

Deoxynivalenol contaminated wheat in swine diets.
J. Anim. Sci., 60, 239-247.

PRELUSKY, D. B., VEIRA, D. M., TRENHOLM, H. L., HARTIN, K.
E., 1986:

Excretion profiles of the mycotoxin deoxynivalenol, following oral and intravenous administration to sheep.
Fund. Appl. Toxic., 6, 356-363.

ROMER., T. R., BOLING, T. M., McDONALD, J. L., 1978:

Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 801-808.

ROSEN, R. T., RUSEN, J. D., 1982:

Presence of four *Fusarium* mycotoxins and synthetic material in "Yellow Rain".
Biomedical Mass Spectrometry, 9, 443-450.

SANO, A., ASABE, Y., TAKITANI, S., UENO Y., 1982:

Fluorodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with nicotinamide and 2-acetylpyridine on a silica gel layer.
J. Chromatogr., 235, 257-265.

SCOTT, P. M., 1983:

Trichothecene problems in Canada. In: UENO, Y.,
Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects. Developments in food science 4.
Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 218-220.

SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., LAU, P.-Y., DEXTER, J. E.,

GREENHALGH, R., 1983:

Effects of experimental flour milling and bread-baking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard red spring wheat.
Cereal Chem., 60, 421-424.

SCOTT, P. M., LAU, P.-Y., KANHERE, S. R., 1981:

Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 1364-1371.

SNYDER, W. C., HANSEN, N. N., 1945:

The species concept in *Fusarium* with reference to *discolor* and other sections.

Am. J. Bot., 32, 657-666.

STAHR, H. M., KRAFT, A. A., SCHUH, M., 1979:

The determination of T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol in foods and feeds.

Appl. Spectrosc., 33, 294-297.

SWANSON, S. P., DAHLEM, A. M., ROOD, H. D., COTE, L. M.,

BUCK, W. B., 1986:

Gas chromatographic analysis of milk for deoxynivalenol and its metabolite DOM-1.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 41-43.

TAKITANI, S., ASABE, Y., KATO, T., SUZUKI, M., UENO, Y.,
1979:

Spectrodensitometric determination of trichothecene
mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl)pyridine on silica
gel thin-layer chromatograms.

J. Chromat., 172, 335-342.

TAMM, C., 1977:

Chemistry and biosynthesis of trichothecenes. In:
RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W., MEHLMAN, M. A.,
Mycotoxins in human and animal health.

Pathotox. Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, 209-228.

TANAKA, T., HASEGAWA, A., MATSUKI, Y., ISHII, K., UENO, Y.,
1985:

Deoxynivalenol and nivalenol in cereals.

Food Additives and Contaminants, 2, 125-137.

THALMANN, A., MATZENAUER, S., GRUBER-SCHLEY, S., 1985:

Untersuchungen über das Vorkommen von Fusarien-
toxinen in Getreide.

Berichte über die Landwirtschaft, 63, 257-272.

TIEBACH, R., BLAAS, W., KELLERT, M., STEINMEYER, S., WEBER,
R., 1985:

Confirmation of nivalenol and deoxynivalenol by one-
line liquid chromatography - mass spectrometry and gas
chromatography - mass spectrometry.

J. Chromatogr., 318, 103-111.

- TRENHOLM, H. L., COCHRANE, W. P., COHEN, H., ELLIOT, J. I.,
FARNWORTH, E. R., FRIEND, D. W., HAMLTON, R. M. G.,
STANDISH, J. F., THOMPSON, B. K., 1983:
Survey of vomitoxin contamination of 1980 Ontario
white winter wheat crop: results of survey and
feeding trials.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66, 92-97.
- TRUCKSESS, M. W., NESHEIM, S., EPPLEY, R. M., 1983:
Thin layer chromatographic determination of deoxy-
nivalenol in wheat and corn.
J. Assoc. Anal. Chem., 67, 40-43.
- TRYPHONAS, H., O'GRADY, L., ARNOLD, D. L., MCGUIRE, P. F.,
KARPINSKI, K., VESONDER, R. F., 1984:
Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral
immunity of mice.
Tox. Letters 23, 17-24.
- TSENG, T.-C., 1983:
Natural occurrence of trichothecenes in Taiwan. In:
UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and
toxicological aspects. Development in food science 4.
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 290-
295.
- UENO, Y., 1980:
Trichothecene mycotoxins - mycology, chemistry, and
toxicology. In: DRAPER, H. H., Advances in nutri-
tional research.
Vol. 3, Plenum Publishing Corporation, 301-353.

UENO, Y., 1985:

The toxicology of mycotoxins.

Critical Reviews in Toxicology, 14, 99-132.

UENO, Y., ISHII, K., SATO, N., OHTSUBO, K., 1974:

Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. VI. Vomiting factor from moldy corn infected with Fusarium species.

Jap. J. Exp. Med., 47, 123-127.

UENO, Y., NAKAJIMA, M., SAKAI, K., ISHII, K., SATO, N., SHIMADA, N., 1973:

Comparative toxicology of trichothecene mycotoxins: Inhibition of protein synthesis in animal cells.

J. Biochem., 74, 285-296.

VESONDER, R. F., 1983:

Natural occurrence in North America. In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects. Developement in food science 4. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 210-217.

VESONDER, R. F., CIEGLER, A., JENSEN, A. H., 1973:

Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn.

Appl. Microbiol., 26, 1008-1010.

- VESONDER, R. F., CIEGLER, A., ROGERS, R. F., BURRIDGE, K. A., BOTHAST, R. J., JENSEN, A. H., 1978:
Survey of 1977 crop year preharvest corn for vomitoxin.
Appl. Envir. Microbiol., 36, 885-888.
- VESONDER, R. F., ELLIS, J. J., KWOLEK, W. F., DeMARINI, D. J., 1982:
Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* NRRL 6101.
Appl. Envir. Microbiol., 43, 967-970.
- VISCONTI, A., PALMISANO, F., 1982:
Interference in the gas chromatographic determination of deoxynivalenol in cultures of *Fusarium solani* on corn.
J. Chromatogr., 252, 305-309.
- WIMMER, J., 1978:
Das Auftreten von Kolbenfusariose beim Mais.
Aktuelle Probleme der landwirtschaftlichen Forschung
77-104.
- WISKOTT, U., 1978:
Untersuchungen über die immunsuppressive Wirksamkeit von Fusariantoxinen.
Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- WOLLENWEBER, H. W., 1932:
Die Gattung *Fusarium*. In: SORAUER, P., Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. III. Die pflanzlichen Parasiten.
Paul Parey Verlag., Berlin.

WOLLENWEBER, H. W., REINKING, O. A., 1935:

Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung.

Paul Parey Verlag, Berlin

YOSHIZAWA, T., 1983:

Red-mold diseases and natural occurrence in Japan.

In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects. Development in food science 4.

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 195-209.

YOSHIZAWA, T., MOROOKA, N., 1974:

Biological modification of trichothecene mycotoxins: acetylation and deacetylation of deoxynivalenol by *Fusarium* spp.

Appl. Microbiol., 29, 54-58.

YOSHIZAWA, T., COTE, L. M., SWANSON, S. P., BUCK, W. B., 1986:

Confirmation of DOM-1, a deepoxidation metabolite of deoxynivalenol, in biological fluids of lactating cows.

Agric. Biol. Chem., 50, 227-229.

YOUNG, J. C., FULCHER, R. G., HAYHOE, J. H., SCOTT, P. M., DEXTER, J. E., 1984:

Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats.

J. Agric. Food Chem., 32, 659-664.

Frau Prof. Dr. B. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas und ihre stets freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich für die mir breitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit.

Bei Herrn Dr. M. Gareis bedanke ich mich für seine wertvollen und hilfreichen Ratschläge bei der Erstellung dieser Arbeit, sowie für die mir jederzeit gewährte, freundliche Aussprache.

Herrn Dr. J. Bauer gilt mein Dank für sein Interesse und seinen freundlichen Rat.

Herrn Dr. R. Wermter möchte ich aufrichtig für seine kollegialen Ratschläge und Anregungen danken.

Für die Assistenz im Labor danke ich besonders Frau Gudrun Matschke, Frau Elisabeth v. Bonin und Frau Marion Hofmann.

Lebenslauf

Name: Henkel

Vorname: Stephan

Geburtsdatum: 11.05.1958

Geburtsort: Nürnberg

Eltern: Lothar Henkel, Zahntechnikermeister
Ursula Henkel, geb. Hauck

Schulbildung: Grundschule Nürnberg-Eibach 1964 - 1968
Dürer-Gymnasium Nürnberg 1968 - 1977
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife 24.07.1977

Wehrdienst: Bad Reichenhall 1977 - 1979

Studium: Tiermedizinisches Studium an der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Abschluß: Staatsexamen am 15.11.1984

Approbation: 27.11.1984

Berufsausübung: Seit November 1984: Veterinäroffizier am
Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der
Bundeswehr MÜNCHEN
Abteilung Veterinärmedizin

